

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 719 864 A2

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:  
03.07.1996 Bulletin 1996/27

(21) Numéro de dépôt: 95402970.8

(22) Date de dépôt: 28.12.1995

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/86, C07K 14/055,  
C07K 14/125, C07K 14/165,  
A61K 39/255, A61K 39/17,  
A61K 39/215

(84) Etats contractants désignés:  
BE DE ES GB IE IT NL PT

(30) Priorité: 30.12.1994 FR 9416017

(71) Demandeur: RHONE MERIEUX  
69002 Lyon (FR)

(72) Inventeurs:  
• Audonnet, Jean-Christophe, Francis  
F-69006 Lyon (FR)  
• Bublot, Michel Joseph Marie  
F-69290 Saint-Genis-Les-Ollieres (FR)

• Darteil, Raphael Jean  
F-69007 Lyon (FR)  
• Duinat, Carole Véronique  
F-69007 Lyon (FR)  
• Laplace, Eliane Louise Françoise  
69600 Oullins (FR)  
• Riviere, Michel Albert Emile  
F-69130 Ecully (FR)

(74) Mandataire: Polus, Camille et al  
c/o Cabinet Lavoix  
2, Place d'Estienne d'Orves  
75441 Paris Cedex 09 (FR)

(54) Vaccin vivant recombinant aviaire, utilisant comme vecteur un virus herpès aviaire

(57) Le vaccin vivant recombinant aviaire comprend, comme vecteur, un virus herpès aviaire comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans la région comprise entre l'ATG de l'ORF UL55 et la jonction de U<sub>L</sub> avec la région répétée adjacente, sous le contrôle du promoteur CMV immediate early. Le vecteur est choisi de préférence parmi le groupe consistant en virus de la maladie de Marek (MDV et HVT), virus de la laryngotrachéite infectieuse ILTV et herpès du canard. Une formule de vaccin multivalent comprend au moins deux vaccins de ce type, avec des séquences insérées différentes.

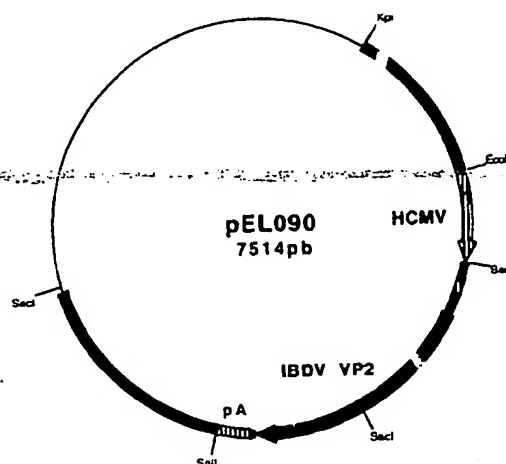


Figure 16

0 719 864 A2

BEST AVAILABLE COPY

## Description

La présente invention a trait à des vaccins à usage aviaire à base de virus herpès aviaires recombinants vivants, à savoir notamment de virus de la maladie de Marek (MDV), et plus particulièrement de virus HVT (Herpes Virus of Turkey), dans lesquels a été insérée, par recombinaison génétique, au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, dans des conditions assurant une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre ledit agent pathogène. Elle s'applique d'autre part au virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV) et à l'herpès du canard.

On a déjà proposé un certain nombre de vecteurs viraux aviaires recombinants dans l'intention de vacciner les oiseaux contre des agents pathogènes aviaires, notamment des virus pathogènes, parmi lesquels figurent les virus de la maladie de Marek (MDV), de la maladie de Newcastle (NDV), de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV), de la maladie de Gumboro (Infectious Bursal Disease, IBDV), de la bronchite infectieuse (IBV) et de l'anémie aviaire (CAV).

Les vecteurs viraux utilisés comprennent des avipox, en particulier le Fowlpox, (EP-A-0 517 292 ; H.-G. Heine *et al.*, Arch. Virol. 1993. 131. 277-292 ; D.B. Boyle *et al.*, Veterinary Microbiology 1994. 41. 173-181 ; C.D. Bayliss *et al.*, Arch. Virol. 1991. 120. 193-205), les virus de Marek, notamment les sérotypes 2 et 3 (HVT) (WO-A-87 04463 ; WO-A-89 01040 ; WO-A-93 25665 ; EP-A-0 513 921 ; J. McMillen, Poultry Condemnation Meeting, October 1994, 359-363 ; P.J.A. Sondermeijer *et al.*, Vaccine 1993. 11. 349-357 ; R.W. Morgan *et al.*, Avian Diseases 1992. 36. 858-870, et 1993. 37. 1032-1040) ou encore les virus ILTV et l'adénovirus aviaire.

Lorsqu'ils sont utilisés pour la vaccination, ces virus recombinants induisent des protections de niveaux variables, généralement faibles ou partielles, même si, dans de rares cas particuliers, une protection importante peut être démontrée.

Parmi les protections les plus difficiles à assurer par des vaccins aviaires vivants recombinants, se trouve celle contre le virus de la maladie de Gumboro, ou virus IBDV. En effet, bien qu'il existe des vaccins vivants atténués ou inactivés classiques efficaces contre cette maladie, aucun vaccin vivant recombinant n'a encore fait preuve d'une efficacité convenable.

Le génome du virus de la maladie de Gumboro est constitué d'un ARN double brin. Le segment le plus grand (segment A) code pour une polyprotéine de 115 kDa secondairement clivée en trois protéines VP2 (41 kDa), VP4 (28 kDa), VP3 (32 kDa). VP4 serait une protéase intervenant dans la maturation de la polyprotéine 115 kDa. La position du site de clivage entre VP2 et VP4 n'est déterminée qu'approximativement (M. Jagadish, J. Virol. 1988. 62. 1084-1087). La protéine VP2 est un immunogène induisant des anticorps neutralisants et une protection contre la maladie de Gumboro.

On a déjà proposé d'insérer des gènes codant pour des protéines immunogènes d'IBDV dans divers vecteurs vivants : EP-A-0 517 292 (insertion de séquences codant pour VP2 ou la polyprotéine dans un avipox) ; C.D. Bayliss 1991, H.-G. Heine 1993 et D.B. Boyle 1994 *supra* (VP2 dans le Fowlpox).

Les virus de la maladie de Marek ont également été proposés dans WO-A-90 02802 et WO-A-90 02803 (sites d'insertion divers tels que gC, TK, RR1, RR2), dans les demandes de brevet français n° 90 03105 (RR2) et 90 11146 (US3), ainsi que, notamment, dans les demandes de brevet WO-A-87 04463 et WO-A-89 01040 (BamHI #16 et #19) et WO-A-93 25655 (US2).

R.J. Isfort *et al.* (Virology 1994. 203. 125-133) ont déterminé un certain nombre de sites d'intégration de rétrovirus dans le génome de HVT, sites qui sont situés dans les fragments de restriction BamHI F, A et I.

Divers promoteurs, y compris ceux généralement disponibles dans le commerce, ont été utilisés dans les différentes constructions de l'art antérieur, parmi lesquels les promoteurs PRV gX, HCMV IE (CMV immediate early humain), herpès simplex alpha-4, FPV P.E/L (promoteur Fowlpox) (H. Heine *et al.*, Arch. Virol. 1993. 131. 277-292), P7.5 (C. Bayliss *et al.*, Arch. Virol. 1991. 120. 193-205) et P11 du virus de la vaccine (D. Boyle *et al.* Vet. Microb. 1994. 41. 173-181), provenant de la séquence LTR du virus RSV (Rous Sarcoma Virus), SV40 précoce, ainsi que des promoteurs MDV ou HVT, tels que les promoteurs des gènes gB, gC, TK, RR2, etc., sans qu'ait pu apparaître une règle, notamment dans le cas des constructions dans HVT. Les séquences de certains promoteurs peuvent inhiber la réplication des vecteurs recombinants HVT ou MDV (D.R. Marshall *et al.*, J. Vir. Meth. 1992. 40. 195-204 et Virology 1993. 195. 638-648). Parmi les promoteurs cités, un certain nombre, comme par exemple SV40, LTR RSV et PRV gX, ont montré une certaine efficacité, de même que certains promoteurs propres de certains gènes des virus Marek, notamment de sérotype 3.

L'invention a permis de mettre au point un vaccin vivant recombinant à base d'un vecteur HVT dans lequel est insérée au moins une séquence codant pour un immunogène aviaire, en particulier la protéine VP2 d'IBDV. Un tel vaccin incorporant une séquence codant pour VP2 assure une protection satisfaisante des animaux contre la maladie de Gumboro, à savoir protection vis-à-vis de la mortalité et des lésions de la bourse de Fabricius.

La présente invention a pour objet un vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus herpès aviaire comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans la région comprise entre l'ATG de l'ORF UL55 et la jonction de U<sub>L</sub> avec la région répétée adjacente, sous le contrôle du promoteur CMV immediate early. Cette région d'insertion correspond chez HVT au fragment BamHI I et chez MDV au fragment BamHI K + H, tels que présen-

tés par A.E. Buckmaster dans J. Gen. Virol. 1988. 69. 2033-2042.

Les virus herpès aviaires selon l'invention sont de préférence les virus de la maladie de Marek, notamment HVT, le virus de la laryngotrachéite infectieuse ILTV et l'herpès du canard. Les virus de la maladie de Marek et plus particulièrement le virus HVT sont préférés.

Le fragment de restriction BamHI I de HVT comprend plusieurs ORF et trois régions intergéniques et, en tant que région d'insertion selon l'invention, comprend plusieurs zones préférées d'insertion, à savoir les trois régions intergéniques 1, 2 et 3 qui sont les régions préférées, et l'ORF UL55.

Par insertion dans la région d'insertion, on entend notamment insertion sans délétion ou avec délétion de quelques bases pour les zones intergéniques et avec délétion totale ou partielle ou sans délétion pour les ORF.

Par promoteur CMV immediate early (IE), on entend le fragment donné dans les exemples ainsi que ses sous-fragments conservant la même activité promotrice.

Le promoteur CMV IE peut être le promoteur humain (HCMV IE) ou le promoteur murin (MCMV IE), ou encore un promoteur CMV IE d'une autre origine, par exemple du rat ou du cochon d'Inde.

La séquence nucléotidique insérée dans le vecteur Marek pour être exprimée peut être toute séquence codant pour un polypeptide antigénique, d'un agent pathogène aviaire, capable, une fois exprimé dans les conditions favorables procurées par l'invention, d'assurer une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre l'agent pathogène. On pourra donc insérer, dans les conditions de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour les antigènes d'intérêt pour une maladie donnée.

Les vaccins selon l'invention pourront être utilisés pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'1 jour ou plus et des adultes.

L'invention peut notamment être utilisée pour l'insertion d'une séquence nucléotidique codant convenablement pour le polypeptide VP2 du virus IBDV. On obtient ainsi un vaccin vivant recombinant assurant, en plus d'une protection contre la maladie de Marek, une protection satisfaisante contre la maladie de Gumboro. Si on le souhaite, on peut aussi insérer une séquence codant pour un autre antigène d'IBDV, tel que VP3 ou encore la polyprotéine VP2 + VP4 + VP3, ces autres possibilités n'étant pas préférées.

Le vaccin recombinant contre la maladie de Gumboro se présentera de préférence sous de 10 à 10<sup>4</sup> pfu/dose.

D'autres cas préférés de l'invention sont l'insertion de séquences nucléotidiques codant pour des antigènes du virus de la maladie de Marek, en particulier gènes gB, gC, gD, et gH + gL (WO-A-90 02803), du virus de la maladie de Newcastle, en particulier gènes F et HN, du virus de la bronchite infectieuse (IBV), en particulier gènes S et M (M. Binns *et al.*, J. Gen. Virol. 1985. 66. 719-726 ; M. Boursnell *et al.*, Virus Research 1984. 1. 303-313), du virus de l'anémie aviaire (CAV), en particulier VP1 (52

kDa) + VP2 (24 kDa) (N.H.M. Noteborn *et al.*, J. Virol. 1991. 65. 3131-3139) et du virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV), en particulier gB (WO-A-90 02802), gC, gD et gH + gL.

Les doses seront de préférence les mêmes que celles pour le vaccin de Gumboro.

Selon un développement avantageux de l'invention, on associe au promoteur CMV IE un autre promoteur selon une disposition tête-bêche, ce qui permet d'insérer, dans la zone d'insertion, deux séquences nucléotidiques, l'une sous la dépendance du promoteur CMV IE, l'autre sous celle du promoteur associé. Cette construction est remarquable par le fait que la présence du promoteur CMV IE, et notamment de sa partie activatrice (enhancer), active la transcription induite par le promoteur associé. Un promoteur associé préféré est le promoteur Marek RNA1.8, dont l'activité de transcription s'est révélée multipliée environ par 4,4 dans ces conditions.

Un cas intéressant de l'invention est un vaccin comprenant une séquence nucléotidique codant pour VP2 d'IBDV sous le contrôle de CMV IE et une séquence nucléotidique codant pour un antigène d'une autre maladie aviaire, notamment celles citées plus haut, sous le contrôle de l'autre promoteur.

On peut aussi monter tête-bêche deux promoteurs CMV IE d'origines différentes.

Le promoteur RNA1.8 pourra aussi être utilisé seul à la place du promoteur CMV IE, notamment pour des vaccins contre la maladie de Marek, la maladie de Newcastle, la laryngotrachéite infectieuse, la bronchite infectieuse et l'anémie aviaire.

La présente invention a aussi pour objet une formule de vaccin multivalent, comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants aviaires tels que définis plus haut, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes, notamment de pathogènes différents.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de vaccination aviaire comprenant l'administration d'un vaccin vivant recombinant ou d'une formule de vaccin multivalent tel que défini plus haut. Elle a notamment pour objet une telle méthode pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'1 jour ou plus et des adultes.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

- Figure 1 : Séquence du fragment HVT BamHI I
- Figure 2 : plasmide pEL039
- Figure 3 : plasmide pEL077
- Figure 4 : plasmide pEL079
- Figure 5 : plasmide pEL076
- Figure 6 : plasmide pEL078
- Figure 7 : plasmide pEL054
- Figure 8 : plasmide pEL055
- Figure 9 : plasmide pEL062

Figure 10 : plasmide pEL066  
 Figure 11 : plasmide pEL022  
 Figure 12 : plasmide pEL023  
 Figure 13 : plasmide pEL024  
 Figure 14 : plasmide pCMV $\beta$   
 Figure 15 : plasmide pEL026  
 Figure 16 : plasmide pEL090  
 Figure 17 : plasmide pCD002  
 Figure 18 : plasmide pCD009  
 Figure 19 : plasmide pEL068  
 Figure 20 : plasmide pEL070  
 Figure 21 : plasmide pEL091  
 Figure 22 : plasmide pCD011  
 Figure 23 : plasmide pCD020  
 Figure 24 : plasmide pEL092  
 Figure 25 : Séquence du gène NDV HN  
 Figure 26 : plasmide pEL028  
 Figure 27 : plasmide pEL029bis  
 Figure 28 : plasmide pEL030  
 Figure 29 : plasmide pEL032  
 Figure 30 : plasmide pEL093  
 Figure 31 : plasmide pEL033  
 Figure 32 : plasmide pEL034  
 Figure 33 : plasmide pEL094  
 Figure 34 : Séquence du promoteur MDV RNA 1.8 kpb  
 Figure 35 : plasmide pBS002  
 Figure 36 : plasmide pEL069  
 Figure 37 : plasmide pEL080  
 Figure 38 : plasmide pEL081  
 Figure 39 : plasmide pEL095  
 Figure 40 : plasmide pEL098

Liste des séquences SEQ ID pour les constructions dans les sites intergéniques

SEQ ID N° 1 Séquence du fragment HVT BamHI I  
 SEQ ID N° 2 Oligonucléotide EL102  
 SEQ ID N° 3 Oligonucléotide EL161  
 SEQ ID N° 4 Oligonucléotide EL147  
 SEQ ID N° 5 Oligonucléotide EL162  
 SEQ ID N° 6 Oligonucléotide EL154  
 SEQ ID N° 7 Oligonucléotide EL163  
 SEQ ID N° 8 Oligonucléotide EL164  
 SEQ ID N° 9 Oligonucléotide EL165  
 SEQ ID N° 10 Oligonucléotide EL132  
 SEQ ID N° 11 Oligonucléotide EL133  
 SEQ ID N° 12 Oligonucléotide MB070  
 SEQ ID N° 13 Oligonucléotide MB071  
 SEQ ID N° 14 Oligonucléotide CD001  
 SEQ ID N° 15 Oligonucléotide CD002  
 SEQ ID N° 16 Oligonucléotide CD003  
 SEQ ID N° 17 Oligonucléotide CD004  
 SEQ ID N° 18 Séquence du gène NDV HN  
 SEQ ID N° 19 Oligonucléotide EL071  
 SEQ ID N° 20 Oligonucléotide EL073  
 SEQ ID N° 21 Oligonucléotide EL074  
 SEQ ID N° 22 Oligonucléotide EL075  
 SEQ ID N° 23 Oligonucléotide EL076

SEQ ID N° 24 Oligonucléotide EL077  
 SEQ ID N° 25 Séquence du promoteur MDV RNA 1.8 kpb  
 SEQ ID N° 26 Oligonucléotide MB047  
 SEQ ID N° 27 Oligonucléotide MB048  
 SEQ ID N° 28 Oligonucléotide MB072

## 2. EXEMPLES

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "Gene-clean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).  
 Le virus utilisé comme virus parental est la souche FC126 de l'herpèsvirus de la dinde (HVT) isolé par le Dr. Witter du Regional Poultry Research Laboratory (USDA, East Lansing, Michigan), dans un troupeau de dindes de 23 semaines (Witter R.L. *et al.* Am. J. Vet. Res. 1970. 31. 525-538). Les conditions de culture de ce virus sont celles décrites par ailleurs (demande de brevet français 90 03105).

### Exemple 1: Extraction de l'ADN du virus de la maladie de Marek:

Le sang total d'un poulet éprouvé à 7 jours avec la souche MDV RB1B est récolté avec une seringue sur anticoagulant (solution d'héparine à 100 UI/ml) 14 jours après infection. Ce sang est ensuite centrifugé à 30 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le plasma ainsi que le "buffy-coat" sont prélevés et dilués dans du PBS stérile pour avoir un volume final de 10 ml. Après une centrifugation de 15 minutes à 150 g, le culot cellulaire est resuspendu dans 2 ml de milieu de culture 199 (Gibco-BRL Cat# 042-01183M) contenant 2 % de sérum de veau foetal (SVF).  
 L'ADN total des lymphocytes infectés est ensuite extrait selon la technique décrite par R. Morgan *et al.* (Avian Diseases. 1990. 34. 345-351) et peut directement servir de matrice pour les expériences de PCR. Pour le clonage de fragments génomiques du virus MDV, la souche RB1B a été cultivée sur CEP et l'ADN viral a été préparé à partir de particules virales purifiées comme décrit par Lee Y. *et al.* (J. Gen. Virol. 1980. 51. 245-253).

### Exemple 2: Préparation de l'ADN génomique du virus MCMV (Mouse CytoMegalovirus)

Le virus MCMV souche Smith a été obtenu de l'American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC N° VR-194). Ce virus a été cultivé sur cellules d'embryon de souris Balb/C et l'ADN viral de ce virus a été préparé comme décrit par Ebeling A. *et al.* (J. Virol. 1983. 47. 421-433).

### Exemple 3: Préparation de l'ADN génomique du virus HVT pour les expériences de transfection:

L'ADN viral utilisé pour les expériences de transfection a été préparé selon la technique décrite par R. Morgan *et al.* (Avian Diseases. 1990. 34. 345-351) à partir d'une culture de CEP secondaires (CEP II) infectées avec la souche FC126 du virus HVT.

### Exemple 4: Description du fragment BamHI I

Le fragment BamHI I de 5,8 kpb du virus HVT souche FC126 (Igarashi T. *et al.* J. Gen. Virol. 1989. 70. 1789-1804) a été isolé par Geneclean et cloné dans le site BamHI du vecteur pBS-SK+ pour donner le plasmide pEL037. La séquence de ce fragment a été établie en totalité (5838 pb) (figure 1 et SEQ ID N° 1). 6 cadres ouverts de lecture (= "open reading frames = ORFs") ont été identifiés sur cette séquence. L'étude des protéines potentiellement codées par ces ORFs a révélé que certaines de ces protéines présentaient une homologie avec des protéines codées par des ORFs présentes chez d'autres alphaherpèsvirus. La première ORF (ORF1) (position 676 à position 1209 sur SEQ ID N° 1) présente une homologie avec les ORFs HSV-1 UL55, EHV-1 gène 4 et VZV gène 5, et code pour une protéine théorique HVT UL55 de 178 acides aminés (aa). L'ORF2 est située de la position 1941 à la position 1387 sur la séquence SEQ ID N° 1 et code pour une protéine de 185 aa homologue de la protéine codée par l'ORF EHV-1 gène 3. L'ORF3 est incomplète. Elle est située de la position 5838 à 3573 sur SEQ ID N° 1 et elle présente une homologie avec l'ORF 21 de MDV (Ross N. *et al.* Virus Genes. 1993. 7. 33-51). Trois autres ORFs identifiées sur cette séquence : ORF4 (position 1403 à position 1957 (protéine de 185 aa)), ORF5 (position 3081 à position 2287 (protéine de 265 aa)), et ORF6 (incomplète ; position 479 à position 1) n'ont pas d'homologues dans les banques de séquences. L'organisation génomique du fragment BamHI I du virus HVT souche FC126 est telle qu'il existe 3 régions intergéniques qui peuvent être utilisées comme sites d'insertion pour des cassettes d'expression de gènes étrangers :

Une région intergénique (région intergénique 1) existe entre l'ORF UL55 et l'ORF HVT gène 3. Une deuxième région intergénique (région intergénique 2) existe entre l'ORF HVT gène 3 et l'ORF 265 aa. Une troisième région intergénique (région intergénique 3) existe entre l'ORF 265 aa et l'ORF 21. Ces trois régions sont utilisables pour insérer des cassettes d'expression sans affecter la répllication *in vivo* des virus HVT recombinants ainsi obtenus. Des exemples de constructions de plasmides donneurs pour ces régions intergéniques 1, 2 et 3 sont décrits ci-dessous :

### Exemple 5: Construction du plasmide donneur pour la région intergénique 1

Le plasmide pEL037 a été digéré par BamHI et EcoRI pour isoler les fragments BamHI-EcoRI de 2672 pb et 2163 pb. Ces fragments ont été ligaturés avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par BamHI et EcoRI, pour donner respectivement les plasmides pEL039 de 5167 pb et pEL040 de 6104 pb. Le plasmide pEL039 (figure 2) a été digéré par BamHI et PstI pour isoler le fragment BamHI-PstI de 997 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL102 (SEQ ID N° 2) 5' CATTATAAGAC-CAACGTGCGAGTC 3'

EL161 (SEQ ID N° 3) 5, GTTCACGTCGACAATTATTT-TATTTAATAAC 3'

et la matrice pEL039 pour produire un fragment de 420 pb. Ce fragment a été digéré par PstI et Sall pour isoler un fragment PstI-Sall de 250 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBSII-SK+ (Stratagene), préalablement digéré par BamHI et Sall, pour donner le plasmide pEL077 de 4160 pb (figure 3). Le plasmide pEL039 a été digéré par BstBI et Scal pour isoler un fragment BstBI-Scal (bout franc) de 475 pb (fragment C). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants :

EL147 (SEQ ID N° 4) 5' AAGATAATGGGCTCCCGC-TGTTTC 3'

EL162 (SEQ ID N° 5) 5' TAATTGTCGACCCCGGG-GAATTCGTTTAAATGTTAGTTTATTC 3'

et la matrice pEL039 pour produire un fragment PCR de 715 pb. Ce fragment a été digéré par BstBI et Sall pour isoler le fragment BstBI-Sall de 465 pb (fragment D). Les fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL077, préalablement digéré par ApaI, réparé avec la polymérase Klenow, et digéré par Sall, pour donner le plasmide pEL079 de 5082 pb (figure 4). Ce plasmide contient un poly-linker EcoRI-SmaI-Sall dans le site intergénique 1.

### Exemple 6: Construction du plasmide donneur pour la région intergénique 2

Le plasmide pEL039 (exemple 5) a été digéré par BstBI et PstI pour isoler le fragment BstBI-PstI de 715 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL154 (SEQ ID N° 6) 5' GAAATGCAAACTAACATTAT-TGTC 3'

EL163 (SEQ ID N° 7) 5' GTGTAAATAGTCGACAATATA-GATAACGGGC 3'

et la matrice pEL039 pour produire un fragment PCR de 500 pb. Ce fragment a été digéré par BstBI et Sall pour isoler le fragment BstBI-Sall de 430 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBSII-SK+, préalablement digéré par PstI et Sall, pour donner le plasmide pEL076 de 4081 pb (figure 5). Une autre PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL164 (SEQ ID N° 8) 5' CTATATTGTCGACCCCGGG-  
GAATTCATCGACATGAATAAATAC 3'

EL165 (SEQ ID N° 9) 5' CAATGAAGAAATATTTCTT-  
TGTTCTTGAAATGC 3'

et la matrice pEL039 pour produire un fragment PCR de 565 pb. Ce fragment a été digéré par Sall et SspI pour isoler le fragment Sall-SspI de 535 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL076, préalablement digéré par ApaI, réparé avec la polymérase Klenow, et digéré par Sall, pour donner le plasmide pEL078 de 4598 pb (figure 6). Ce plasmide contient un poly-linker EcoRI-SmaI-Sall dans la région intergénique 2.

#### Exemple 7: Construction du plasmide donneur pour la région intergénique 3

Le plasmide pEL040 (voir exemple 5) a été digéré par NcoI et SphI pour isoler le fragment NcoI-SphI de 1468 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pUC BM20 (Boehringer Mannheim Cat# 1219235), préalablement digéré par NcoI et SphI, pour donner le plasmide pEL054 de 4182 pb (figure 7). Le plasmide pEL040 a été digéré par EcoRI et SphI pour isoler le fragment EcoRI-SphI de 614 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pUC BM20, préalablement digéré par EcoRI et SphI, pour donner le plasmide pEL055 de 3263 pb (figure 8). Le plasmide pEL055 a été digéré par EcoRI, réparé par la polymérase Klenow, ligaturé sur lui-même, digéré par HindIII, réparé avec la polymérase Klenow, et enfin ligaturé sur lui-même pour donner le plasmide pEL062 de 3279 pb (figure 9). Le plasmide pEL054 a été digéré par NcoI et Sall pour isoler le fragment NcoI-Sall de 1492 pb (fragment A). Les deux oligonucléotides suivants:

EL132 (SEQ ID N° 10) 5' CCGAATTCATATAAGCT-TACGTG 3'

EL133 (SEQ ID N° 11) 5' TCGACACGTAAGCTTATA-TGAATTCGGCATG 3'

ont été hybridés entre eux pour produire le fragment Sall-SphI de 24 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL062, préalablement digéré par NcoI et SphI, pour donner le plasmide pEL066 de 4787 pb (figure 10). Ce plasmide contient un poly-linker EcoRI-HindIII-Sall dans la région intergénique 3.

#### Exemple 8: Construction du plasmide donneur pEL090 et isolement de vHVT16

Le plasmide pEL004 (= plasmide pGH004 décrit dans la demande de brevet français 92.13109) contenant le gène IBDV VP2 sous forme d'une cassette BamHI-HindIII a été digéré par BamHI et XbaI pour isoler le fragment BamHI-XbaI (gène VP2 tronqué) de 1104 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré avec XbaI et BamHI pour donner le plasmide pEL022 de 4052 pb (figure 11). Le vecteur pBS-SK+ a été digéré par EcoRV et XbaI, puis ligaturé sur lui-même pour donner pBS-SK' (modifié). Le plasmide

pEL004 a été digéré par KpnI et HindIII pour isoler le fragment KpnI-HindIII de 1387 pb contenant le gène IBDV VP2 complet. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK', préalablement digéré par KpnI et HindIII, pour donner le plasmide pEL023 de 4292 pb (figure 12). Le plasmide pEL022 a été digéré par BamHI et NotI pour isoler le fragment BamHI-NotI de 1122 pb (fragment A). Le plasmide pEL023 a été digéré par BamHI et NotI pour isoler le fragment BamHI-NotI de 333 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par NotI et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL024 de 4369 pb (figure 13). Le plasmide pEL024 a été digéré par NotI pour isoler le fragment NotI-NotI de 1445 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMV $\beta$  (Clontech Cat# 6177-1) (figure 14), préalablement digéré par NotI, pour donner le plasmide pEL026 de 5095 pb (figure 15). Le plasmide pEL026 a été digéré par EcoRI, Sall et XmnI pour isoler le fragment EcoRI-Sall de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL090 de 7514 pb (figure 16). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression HCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Des cellules CEP primaires de 24 heures ont ensuite été transfectées avec le mélange suivant: 1  $\mu$ g de plasmide pEL090 linéarisé + 5  $\mu$ g d'ADN viral d'HVT dans 300  $\mu$ l de milieu OptiMEM (Gibco BRL Cat# 041-01985H) et 100  $\mu$ g de LipofectAMINE dilués dans 300  $\mu$ l de milieu (volume final du mélange = 600  $\mu$ l). Ces 600  $\mu$ l ont ensuite été dilués dans 3 ml (volume final) de milieu et étalés sur 3.10<sup>6</sup> CEP I. Le mélange a été laissé en contact avec les cellules pendant 5 heures, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les cellules ont alors été laissées en culture pendant 3 jours à + 37°C, puis elles ont été pronasées, mélangées à des CEP II fraîches (mélange 3:1), et réétalées sur 1 plaque 96 puits. Cette plaque a été laissée en culture pendant 3 jours, puis les cellules ont été pronasées, mélangées à des CEP II fraîches, et réétalées sur 2 plaques de 96 puits, une cupule initiale donnant 2 cupules soeurs. Les plaques 96 puits ont été mises en culture jusqu'à apparition d'un effet cytopathique. Après 72 heures de culture, une des deux plaques 96 puits a été fixée à l'acétone 95% pendant 30 minutes et une réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) a été réalisée avec un anticorps monoclonal anti-VP2 pour rechercher les plages exprimant la protéine VP2. Les cupules "soeurs" des cupules présentant des plages positives en IFI ont été pronasées, mélangées à des CEP II fraîches, et déposées en dilution limite sur des plaques 96 puits. Après 3 jours de culture, les cupules présentant un effet cytopathique ont été pronasées, mélangées à des CEP II, et réétalées sur des plaques 96 puits, une cupule initiale donnant 2 cupules soeurs. 3 jours après, les plages exprimant la protéine VP2 ont été à nouveau recherchées comme précédemment par IFI sur l'une des 2 plaques soeurs. En général, 4 cycles d'isolement successifs (récolte

d'une cupule, réétalement, contrôle par IFI, repiquage d'un cupule soeur...) suffisent pour obtenir des virus recombinants dont la totalité de la progénie présente une fluorescence spécifique. Une plage virale ayant donné 100 % de plages positives en IFI avec un anticorps monoclonal anti-VP2 a été désignée vHVT16. L'ADN génomique de ce virus recombinant a été caractérisé au niveau moléculaire par des techniques classiques de PCR et de Southern blot en utilisant les oligonucléotides et les sondes d'ADN appropriés.

#### Exemple 9: Construction du plasmide donneur pEL091 et isolement de vHVT17

Le plasmide pCMV $\beta$  (figure 14) a été digéré par Sall et SmaI pour isoler le fragment Sall-SmaI de 3679 pb contenant le gène *lacZ* ainsi que le signal de poly-adénylation du gène tardif du virus SV40. Ce fragment a été inséré dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par Sall et EcoRV, pour donner le plasmide pCD002 de 6625 pb (figure 17). Ce plasmide contient le gène reporter *lacZ* mais aucun promoteur n'est situé en amont de ce gène. L'ADN génomique viral du virus MCMV a été préparé comme décrit dans l'exemple 2 et digéré par PstI pour isoler le fragment PstI-PstI de 2285 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par PstI et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pCD004. Le plasmide pCD004 a été digéré par HpaI et PstI pour isoler le fragment HpaI-PstI de 1389 pb qui contient la région promotrice/activatrice du gène Immediate-Early du cytomégalo virus murin (MURINE CYTOMEGALOVIRUS = MCMV) (Dorsch-Häslar K. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. 82. 8325-8329, et demande de brevet WO-A-87/03905). Ce fragment a été cloné dans le plasmide pCD002 préalablement digéré par PstI et SmaI, pour donner le plasmide pCD009 de 8007 pb (figure 18). Un oligonucléotide double brin a été obtenu par hybridation des deux oligonucléotides suivants :

MB070	(SEQ	ID	N°	12)	5'
CGAATTCAGTGTGTGTCTGCAGGCG-					
GCCGCGTGTGTGTGACGGTAC 3'					
MB071	(SEQ	ID	N°	13)	5'
CGTCGACACACACGCGCGCCGCTGCAGA-					
CACACACTAGTGAATTCGAGCT 3'					

Cet oligonucléotide double brin a été ligaturé dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par KpnI et SacI, pour donner le plasmide pEL067.

Le plasmide pCD009 a été digéré par PstI et SpeI pour isoler le fragment PstI-SpeI de 1396 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL067, préalablement digéré par PstI et SpeI, pour donner le plasmide pEL068 de 4297 pb (figure 19). Le plasmide pEL026 (voir exemple 8) a été digéré par HindIII et Sall pour isoler le fragment HindIII-Sall de 235 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL068, préalablement digéré par NotI et Sall, pour donner le plasmide pEL070 de 5908 pb (figure 20). Le plasmide pEL070 a été digéré par EcoRI, Sall et XmnI pour

isoler le fragment EcoRI-Sall de 3035 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL091 de 8109 pb (figure 21). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique 1 du virus HVT. Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL091 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT17.

#### Exemple 10: Construction du plasmide donneur pEL092 et isolement de vHVT18

Le fragment EcoRI-Sall de 3,9 kpb de l'ADN génomique du virus MDV souche RB1B contenant le gène MDV gB (séquence publiée par Ross N. *et al.* J. Gen. Virol. 1989. 70. 1789-1804) a été ligaturé avec le vecteur pUC13, préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pCD007. Ce plasmide a été digéré par SacI et XhoI pour isoler le fragment SacI-XhoI de 2260 pb (partie centrale du gène gB = fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD001 (SEQ ID N° 14) 5' GACTGGTACCGCGGCCG-CATGCACTTTT TAGCGGAATTG 3'

CD002 (SEQ ID N° 15) 5' TTCGGGACATTTTCGCGG 3' et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 222 pb. Ce fragment a été digéré par KpnI et XbaI pour isoler un fragment KpnI-XbaI de 190 pb (extrémité 5' du gène gB = fragment B). Une autre PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD003 (SEQ ID N° 16) 5' TATATGGCGTTAGTCTCC 3' CD004 (SEQ ID N° 17) 5' TTGCGAGCTCGCGGCGCTTATTACACAGCATCATCTCTG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 195 pb. Ce fragment a été digéré par SacI et SacII pour isoler le fragment SacI-SacII de 162 pb (extrémité 3' du gène gB = fragment C). Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par KpnI et SacI, pour donner le plasmide pCD011 de 5485 pb (figure 22). Le plasmide pCD011 a été digéré par NotI pour isoler le fragment NotI-NotI de 2608 pb (gène MDV gB entier). Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMV $\beta$ , préalablement digéré par NotI et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pCD020 de 6299 pb (figure 23) (Dans ce plasmide, le gène MDV gB remplace le gène *lacZ*). Le plasmide pCD020 a été digéré par EcoRI et Sall pour isoler le fragment EcoRI-Sall de 3648 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL092 de 8718 pb (figure 24). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression HCMV-IE/MDV gB dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL092 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT18.



### Exemple 11 : Construction du plasmide donneur pEL093 et isolement de vHVT19

La constitution d'une banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV), souche Texas, a été réalisée comme décrit par Taylor J. *et al.* (J. Virol. 1990. 64. 1441-1450). Un clone pBR322 contenant la fin du gène fusion (F), la totalité du gène hémagglutinine-neuraminidase (HN) et le début du gène de la polymérase a été identifié pHN01. La séquence du gène NDV HN présent sur ce clone est présentée sur la figure 25 (SEQ ID N° 18). Le plasmide pHN01 a été digéré par SphI et XbaI pour isoler le fragment SphI-XbaI de 2520 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pUC19, préalablement digéré par SphI et XbaI, pour donner le plasmide pHN02 de 5192 pb. Le plasmide pHN02 a été digéré par ClaI et PstI pour isoler le fragment ClaI-PstI de 700 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL071 (SEQ ID N° 19) 5' CAGACCAAGCTTCT-TAAATCCC 3'

EL073 (SEQ ID N° 20) 5' GTATTCGGGACAATGC 3' et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 270 pb. Ce fragment a été digéré par HindIII et PstI pour isoler un fragment HindIII-PstI de 220 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par ClaI et HindIII, pour donner le plasmide pEL028 de 3872 pb (figure 26). Le plasmide pHN02 a été digéré par BspHI et ClaI pour isoler le fragment BspHI-ClaI de 425 pb (fragment C). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL074 (SEQ ID N° 21) 5' GTGACATCACTAGCGT-CATCC 3'

EL075 (SEQ ID N° 22) 5' CCGCATCATCAGCGGC-CGCGATCGGTCATGGACAGT 3' et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 425 pb. Ce fragment a été digéré par BspHI et NotI pour isoler le fragment BspHI-NotI de 390 pb (fragment D). Les fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par ClaI et NotI, pour donner le plasmide pEL029bis de 3727 pb (figure 27). Le plasmide pEL028 a été digéré par ClaI et SacII pour isoler le fragment ClaI-SacII de 960 pb (fragment E). Le plasmide pEL029bis a été digéré par ClaI et NotI pour isoler le fragment ClaI-NotI de 820 pb (fragment F). Les fragments E et F ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par NotI et SacII, pour donner le plasmide pEL030 de 4745 pb (figure 28). Le plasmide pEL030 a été digéré par NotI pour isoler le fragment NotI-NotI de 1780 pb (gène NDV HN entier). Ce fragment a été ligaturé, à la place du gène *lacZ*, avec le plasmide pCMV $\beta$ , préalablement digéré par NotI et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL032 de 5471 pb (figure 29). Le plasmide pEL032 a été digéré par EcoRI et ClaI pour isoler le fragment EcoRI-ClaI de 1636 pb (fragment G). Le plasmide pEL032 a été digéré par ClaI et Sall pour isoler le fragment ClaI-Sall de 1182 pb (fragment H). Les fragments

G et H ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL093 de 7890 pb (figure 30). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression HCMV-IE/NDV HN dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL093 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT19.

### Exemple 12: Construction du plasmide donneur pEL094 et isolement de vHVT20

Un clone provenant de la banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (voir exemple 11) et contenant le gène fusion (F) en entier a été appelé pNDV81. Ce plasmide a été décrit précédemment et la séquence du gène NDV F présent sur ce clone a été publiée (Taylor J. *et al.* J. Virol. 1990. 64. 1441-1450). Le plasmide pNDV81 a été digéré par NarI et PstI pour isoler le fragment NarI-PstI de 1870 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL076 (SEQ ID N° 23) 5' TGACCCTGTCTGGGATGA 3' EL077 (SEQ ID N° 24) 5' GGATCCCGGTCGACACAT-TGCGGCCGCAAGATGGGC 3'

et la matrice pNDV81 pour produire un fragment de 160 pb. Ce fragment a été digéré par PstI et Sall pour isoler le fragment PstI-Sall de 130 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par ClaI et Sall, pour donner le plasmide pEL033 de 4846 pb (figure 31). Le plasmide pEL033 a été digéré par NotI pour isoler le fragment NotI-NotI de 1935 pb (gène F entier). Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMV $\beta$ , préalablement digéré par NotI et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL034 de 5624 pb (le gène NDV F a remplacé le gène *lacZ*) (figure 32). Le plasmide pEL034 a été digéré par EcoRI et KpnI pour isoler le fragment EcoRI-KpnI de 866 pb (fragment C). Le plasmide pEL034 a été digéré par KpnI et Sall pour isoler le fragment KpnI-Sall de 2114 pb (fragment D). Les fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL094 de 8043 pb (figure 33). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression HCMV-IE/NDV F dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL094 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT20.

### Exemple 13: Construction du plasmide donneur pEL095 et isolement de vHVT21

Les séquences situées en amont du gène MDV RNA 1.8 kpb sont décrites dans Bradley G. *et al.* (J. Virol. 1989.



63. 2534-2542) (figure 34 et SEQ ID N° 25). Une amplification PCR a été réalisée à partir d'ADN extrait de lymphocytes récoltés sur des poulets infectés par la souche MDV RB1B (voir exemple 1) avec les oligonucléotides suivants:

MB047 (SEQ ID N° 26) 5' GGTCTACTAGTATTG-GACTCTGGTGC GAACGC 3'

MB048 (SEQ ID N° 27) 5' GTCCAGAATTCGCGAAGA-GAGAAGGAACCTC 3'

Le fragment PCR de 163 pb ainsi obtenu a été digéré par EcoRI et SpeI, puis ligaturé avec le plasmide pCD002 (voir exemple 9), préalablement digéré par EcoRI et SpeI, pour donner le plasmide pBS002 de 6774 pb (figure 35). Le plasmide pBS002 contient le promoteur du gène MDV RNA 1.8 kb cloné en amont du gène *lacZ*.

Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides:

MB047 (SEQ ID N° 26) et

MB072 (SEQ ID N° 28) 5' GTGTCTCTGCAGTCGCGAAGAGAGAAGGAACCTC 3'

et la matrice pBS002. Le fragment PCR ainsi obtenu a été digéré par PstI et SpeI pour isoler un fragment PstI-SpeI de 200 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL067 (voir exemple 9), préalablement digéré par PstI et SpeI, pour donner le plasmide pEL069 (figure 36). Le plasmide pCD007 (voir exemple 10) a été digéré par EcoRI et XbaI pour isoler le fragment EcoRI-XbaI de 2670 pb (fragment A). Le plasmide pCD011 (voir exemple 10) a été digéré par NotI et XbaI pour isoler le fragment NotI-XbaI de 180 pb (fragment B). Le plasmide pEL069 a été digéré par NotI et SpeI pour isoler le fragment NotI-SpeI de 180 pb (fragment C). Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL067 (voir exemple 9), préalablement digéré par EcoRI et SpeI, pour donner le plasmide pEL080 de 5939 pb (figure 37). Le plasmide pEL070 (voir exemple 9) a été digéré par KpnI et SpeI pour isoler le fragment KpnI-SpeI de 1345 pb (fragment D). Le plasmide pEL070 a aussi été digéré par KpnI et Sall pour isoler le fragment KpnI-Sall de 1658 pb (fragment E). Les fragments D et E ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL080, préalablement digéré par Sall et SpeI, pour donner le plasmide pEL081 de 8938 pb (figure 38). Le plasmide pEL081 a été digéré par EcoRI et Sall pour isoler le fragment EcoRI-Sall de 6066 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner finalement le plasmide pEL095 de 11139 pb (figure 39). Ce plasmide permet d'insérer la double cassette d'expression VP2/MCMV-IE//RNA 1.8 kpb/MDV gB dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL095 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT21.

#### Exemple 14: Construction du plasmide donneur pEL098 et isolement de vHVT24

Le plasmide pEL080 (voir exemple 13) a été digéré par EcoRI et Sall pour isoler le fragment EcoRI-Sall de 3040 pb (cassette RNA 1.8 kpb / MDV gB). Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL079 (voir exemple 5), préalablement digéré par EcoRI et Sall, pour donner le plasmide pEL098 de 8140 pb (figure 40). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette RNA 1.8 kpb / MDV gB dans le site intergénique 1 du virus HVT.

Une co-transfection réalisée, comme décrit dans l'exemple 8, avec le plasmide pEL098 et l'ADN génomique du virus HVT a conduit à l'isolement et à la purification du recombinant vHVT24.

#### Exemple 15: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression IBV M et S dans le site intergénique 1 du virus HVT

Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de cassettes d'expression (gènes placés sous le contrôle des promoteurs HCMV-IE ou MCMV-IE ou double promoteur MCMV-IE//RNA 1.8 kpb) dans le site intergénique 1, il est possible de réaliser des virus HVT recombinants exprimant à un niveau élevé les protéines membrane (M) ou spike (S) du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV). On réalise de préférence une construction où le gène IBV S est sous la dépendance du promoteur HCMV-IE ou du promoteur MCMV-IE, ou bien une construction où les gènes IBV M et IBV S sont insérés ensemble avec le double promoteur MCMV-IE/RNA 1.8 kpb dans le site intergénique 1, le gène M étant sous le contrôle du promoteur RNA 1.8 kpb et le gène S étant sous le contrôle du promoteur MCMV-IE. Dans cette configuration, le promoteur RNA 1.8 kpb est activé par la région activatrice du promoteur MCMV-IE.

#### Exemple 16: Construction de virus HVT recombinants comprenant des gènes étrangers insérés dans les sites intergéniques 2 et 3

L'obtention de virus HVT recombinants ayant inséré des cassettes d'expression de gènes étrangers dans les sites intergéniques 2 et 3 se fait en suivant la stratégie décrite pour les exemples 8 à 14, mais en utilisant respectivement les plasmides pEL078 (site intergénique 2) et pEL066 (site intergénique 3) à la place du plasmide pEL079 dans les exemples 8 à 14 pour construire les plasmides donneurs spécifiques.

#### Exemple 17 : Préparation d'un vaccin selon l'invention :

La préparation des vaccins selon l'invention peut se faire par toute technique usuelle connue de l'homme de l'art, par exemple par culture en flacon roulant. Des flacons roulants (175 cm<sup>2</sup>),ensemencés avec 200.10<sup>6</sup> cellules primaires d'embryon de poulet, sont inoculés après

24 heures d'incubation à 37°C avec 1 ml d'une solution virale de virus HVT recombinant ayant un titre de  $10^5$  pfu/ml. Après une incubation de 4 jours à 37°C, le surnageant est éliminé, les cellules sont dissociées avec une solution de trypsine versène, puis récoltées. Les cellules infectées sont alors centrifugées. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises par 20 ml d'une solution contenant un stabilisateur pour lyophilisation (par exemple SPGA saccharose, phosphate, glutamate, albumine). Ce mélange est ensuite soniqué, réparti dans des flacons à raison de fractions de 1 ml et enfin lyophilisé.

Si nécessaire, le vaccin peut également être réparti et congelé au lieu d'être lyophilisé.

#### Exemple 18 :

Un virus recombinant obtenu selon l'invention et exprimant la protéine VP2 du virus de la maladie Gumboro a été utilisé pour immuniser par voie intramusculaire des poussins de 1 jour. Ces poussins ont ensuite été éprouvés à l'âge de 21 jours avec le virus de la maladie de Gumboro. Les résultats de protection ont été évalués 11 jours après épreuve en comparant les lésions de la bourse de Fabricius et la mortalité entre les groupes vaccinés et le groupe témoin non vacciné. Les résultats de ce protocole de vaccination/épreuve ont montré que le vaccin obtenu selon l'invention permet d'obtenir un bon niveau de protection.

#### Revendications

1. Vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus herpès aviaire comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans la région comprise entre l'ATG de l'ORF UL55 et la jonction de  $U_L$  avec la région répétée adjacente, sous le contrôle du promoteur CMV immediate early.
2. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que le vecteur est choisi parmi le groupe consistant en virus de la maladie de Marek (MDV et HVT), virus de la laryngotrachéite infectieuse ILTV et herpès du canard.
3. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 2, caractérisé en ce que le vecteur est le virus HVT et l'insertion est réalisée dans le fragment BamHI I.
4. Vaccin recombinant aviaire selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'insertion est réalisée dans l'une des zones intergéniques 1, 2 et 3 ou dans l'ORF UL55 du fragment BamHI I.
5. Vaccin vivant recombinant aviaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce

que le promoteur CMV immediate early est le promoteur humain HCMV IE ou le promoteur murin MCMV IE.

6. Vaccin vivant recombinant aviaire, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur CMV immediate early est une séquence nucléotidique codant pour un antigène choisi parmi le groupe des antigènes de la maladie de Gumboro, de la maladie de Marek, de la maladie de Newcastle, de la bronchite infectieuse, de la laryngotrachéite infectieuse et de l'anémie aviaire.
7. Vaccin vivant recombinant aviaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur CMV immediate early est une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide VP2 du virus IBDV.
8. Vaccin vivant recombinant aviaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend, associé au promoteur CMV immediate early en disposition tête-bêche avec ce dernier, un autre promoteur, deux séquences nucléotidiques étant insérées dans la région d'insertion, l'une sous la dépendance du promoteur CMV immediate early, l'autre sous celle du promoteur associé.
9. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 8, caractérisé en ce que le promoteur associé est le promoteur Marek RNA1.8.
10. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur CMV immediate early est une séquence nucléotidique codant pour le polypeptide VP2 du virus IBDV et en ce que la séquence nucléotidique insérée sous le contrôle du promoteur associé est une séquence nucléotidique codant pour un antigène d'une autre maladie aviaire.
11. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour un antigène d'une autre maladie aviaire est choisie parmi le groupe des antigènes de la maladie de Marek, de la maladie de Newcastle, de la bronchite infectieuse, de la laryngotrachéite infectieuse et de l'anémie aviaire.
12. Vaccin vivant recombinant aviaire selon la revendication 8, caractérisé en ce que le promoteur associé est un promoteur CMV immediate early d'origine différente.

13. Vaccin vivant recombinant aviaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la ou les séquences nucléotidiques insérées sont choisies parmi le groupe des séquences codant pour les gènes : 5
- VP2, VP3 et VP2 + VP4 + VP3 du virus de la maladie de Gumboro,
  - gB, gC, gD et gH + gL des virus de la maladie de Marek, 10
  - VP1 (52 kDa) + VP2 (24 kDa) du virus de l'anémie aviaire,
  - S et M du virus de la bronchite infectieuse, et
  - gB, gC, gD et gH + gL du virus de la laryngotrachéite infectieuse. 15
14. Vaccin recombinant aviaire selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que, au lieu du promoteur CMV immediate early, on utilise le promoteur RNA1.8. 20
15. Formule de vaccin multivalent comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants aviaires tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes: 25
16. Formule de vaccin multivalent selon la revendication 15, caractérisée en ce que les séquences nucléotidiques insérées différentes proviennent de pathogènes différents. 30

35

40

45

50

55

Figure 1

1 GGATCCATCAGCAATGCGGGCTGTAGTCCCGATTCCCGTTTCAAATGAAGGTGCTCCAAC  
 159 **AspMetLeuLeuAlaProGlnLeuGlySerGluArgLysLeuHisLeuHisGluLeuV**  
 61 ACGGTCTTCAAAGCAACCGGCATACCAGCAAACACAGACTGCAACTCCCCGCTGCAATGA  
 139 **alThrLysLeuAlaValProMetGlyAlaPheValSerGlnLeuGluGlySerCysHisA**  
 121 TTGGTTATAAACAGTAATCTGTCTTCTGGAAGTATATTTGCCCCGACAATCCACGGCGCC  
 119 **snThrIlePheLeuLeuArgAspGluProLeuIleAsnArgGlyValIleTrpProAlaG**  
 181 CCCAAAGTTAAAAACCATCCATGTGTATTTGCGTCTTCTCTGTTAAAGAATATTGACTG  
 99 **lyLeuThrLeuPheTrpGlyHisThrAsnAlaAspGluArgAsnPheSerTyrGlnSerA**  
 241 GCATTTTCCCGTTGACCGCCAGATATCCAAAGTACAGCACGATGTTGCACGGACGACTTT  
 79 **laAsnGluArgGlnGlyGlySerIleTrpLeuValAlaArgHisGlnValSerSerLysA**  
 301 GCAGTCACCAGCCTTCCTTTCCACCCCCCAACAAAATGTTTATCGTAGGACCCATA  
 59 **laThrValLeuArgGlyLysTrpGlyGlyValLeuLeuIleAsnIleThrProGlyMetA**  
 361 TCCGTAATAAGGATGGGTCTGGCAGCAACCCCATAGGCGCCTCGGCGTGGTAGTTCTCGA  
 39 **spThrIleLeuIleProArgAlaAlaValGlyTyrAlaGlyArgArgProLeuGluArgP**  
 421 GGATACATCCAAAGAGGTTGAGTATTCTCTCTACACTTCTTGTTAAATGGAAAGTGCATT  
 19 **roTyrMetTrpLeuProGlnThrAsnGluArgCysLysLysAsnPheProPheHisMet**  
 481 TGCTTGTCTTACAATCGGCCCCGAGTCTCGTTCACAGCGCCTCGTTCACACTTAAACCAC  
 541 AAATAGTCTACAGGCTATATGGGAGCCAGACTGAAACTCACATATGACTAATATTCGGGG  
 601 GTGTTAGTCACGTGTAGCCCATTTGTGTGCATATAACGATGTTGGACGCGTCCTTATTCGG  
 661 GGTGTACTTGATACTATGGCAGCGAGCATGGGATATTATCCTCGTCATCGTTAACATCT  
 1 **MetAlaAlaSerMetGlyTyrSerSerSerSerSerLeuThrSer**  
 721 CTACGGGTTTCAGAATGTTTGGCATGTCTCGATCCTTTGCCCATCGTTGCAAAATACAAG  
 16 **LeuArgValGlnAsnValTrpHisValValAspProLeuProIleValAlaAsnTyrLys**  
 781 TCCGATCGCCATGACCGCGATAAGCCTGTACCATGTGGCATTAGGGTGACATCTCGATCA  
 36 **SerAspArgHisAspArgAspLysProValProCysGlyIleArgValThrSerArgSer**  
 841 TACATTATAAGACCAACGTGCGAGTCTTCCAAAGACCTGCACGCCTTCTTCTTCGGATTG  
 56 **TyrIleIleArgProThrCysGluSerSerLysAspLeuHisAlaPhePhePheGlyLeu**  
 901 TCAACGGGTTCTTTCAGAATCTATGCCCATATCTGGCGTTGAGACCATTGTGCGTTTAATG  
 76 **SerThrGlySerSerGluSerMetProIleSerGlyValGluThrIleValArgLeuMet**  
 961 AACATAAAGCGGCATGCCATGGAAGGAGGGCTGCAGATCTCCATTTTCTCACGCCACT  
 96 **AsnAsnLysAlaAlaCysHisGlyLysGluGlyCysArgSerProPheSerHisAlaThr**  
 1021 ATCCTGGACGCTGTAGACGATAATTATACCATGAATATAGAGGGGGTATGTTTCCACTGC  
 116 **IleLeuAspAlaValAspAspAsnTyrThrMetAsnIleGluGlyValCysPheHisCys**  
 1081 CACTGTGATGATAAGTTTCTCCAGATTGTTGGATATCTGCATTTTCTGCTGCCGAACAA  
 136 **HisCysAspAspLysPheSerProAspCysTrpIleSerAlaPheSerAlaAlaGluGln**  
 1141 ACTTCATCGCTATGCAAAGAGATGCGTGTGTACACGCNGCCGTTGAGTATACGGGAAACT  
 156 **ThrSerSerLeuCysLysGluMetArgValTyrThr???ProLeuSerIleArgGluThr**  
 1201 AAATGTTTCATAGAGGTCTTTGGGCTATATGTTATTAAATAAAATAATTGACCAGTGAACA  
 176 **LysCysSer**  
 1261 ATTTGTTTAATGTTAGTTTATTCAATGCATTGGTTGCAAAATATTCATTACTTCTCCAATG  
 1321 CCAGGTCATTCTTTAGCGAGTGATGTTATGACATTGCTGTGAAAATTACTACAGGATATA  
 1381 TTTTAAAGATGCAGGAGTAACAATGTGCATAGTAGGCGTAGTTATCGCAGACGTGCAACG  
 185 **SerAlaProThrValIleHisMetThrProThrThrIleAlaSerThrCysArg**  
 1 **MetCysIleValGlyValValIleAlaAspValGlnAr**  
 1441 CTTCCGATTTGAGTTACCGAAGTGCCCAACAGTGCTGCGGTTATGGTTTATGCGCACAGA  
 167 **LysAlaAsnSerAsnGlyPheHisGlyValThrSerArgAsnHisAsnIleArgValSer**  
 13 **gPheAlaPheGluLeuProLysCysProThrValLeuArgLeuTrpPheMetArgThrGl**  
 1501 ATCCATGCATGTCCTAATTGAACCATCCGATTTTCTTTTAAATCGCGATCGTTGTTTGGG  
 147 **AspMetCysThrArgIleSerGlyAspSerLysGluLysLeuArgSerArgGlnLysPro**  
 33 **uSerMetHisValLeuIleGluProSerAspPheSerPheAsnArgAspArgCysLeuGl**  
 1561 CAACTGCGTTATTTTCAGATCTAAAAAATTTACCCTTTATGACCATCACATCTCTCTGGCT  
 127 **LeuGlnThrIleGluSerArgPhePheLysGlyLysIleValMetValAspArgGlnSer**  
 53 **yAsnCysValIleSerAspLeuLysAsnLeuProPheMetThrIleThrSerLeuTrpLe**

(Figure 1)

1621 CATACCCCGCTTGGATAAGATATCATGTAGATTCCGCCCTAAGAAATGCAAACCTAACATT  
 107 MetGlyArgLysSerLeuIleAspHisLeuAsnArgGlyLeuPheHisLeuSerValAsn  
 73 uIleProArgLeuAspLysIleSerCysArgPheArgProLysLysCysLysLeuThrLe  
 1681 ATTGTCGGTTCCATATACACTTCCATCTTGTCTTCGAAAATAACAACTCGCGCAATAG  
 87 AsnAspThrGlyTyrValSerGlyAspGlnGlyGluPheIleValPheGluArgLeuLeu  
 93 uLeuSerValProTyrThrLeuProSerCysProSerLysIleThrAsnSerArgAsnAr  
 1741 ACCGTCCGTACATGCATGGCCGATGTGTGTCAACATCATTGGTCTGCTAGATCCCGATGG  
 67 GlyAspThrCysAlaHisGlyIleHisThrLeuMetMetProArgSerSerGlySerPro  
 113 gProSerValHisAlaTrpProMetCysValAsnIleIleGlyLeuLeuAspProAspGl  
 1801 GACGAATCGTACAGTCGTGCTCCAGCATTGGCAAAAATCCCCAGATACCCTCCATGCGG  
 47 ValPheArgValThrThrAlaGlyAlaAsnAlaPheIleGlyLeuTyrGlyGlyHisPro  
 133 yThrAsnArgThrValValAlaProAlaLeuAlaLysIleProArgTyrProCysGl  
 1861 CAAATCTAAATTGCGACCCCGAAGAGACTGCACCAAAGTCTTATCGACGCACGCTGATTT  
 27 LeuAspLeuAsnArgGlyArgLeuSerGlnValLeuThrLysAspValCysAlaSerLys  
 153 yLysSerLysLeuArgProArgArgAspCysThrLysValLeuSerThrHisAlaAspPh  
 1921 TTTTGAACAGCGGGAGCCCATTATCTTCAGTGGAGCGTAGACGGGCGAGGCTAATTATGT  
 74 LysSerCysArgSerGlyMet  
 173 ePheGluGlnArgGluProIleIlePheSerGlyAla  
 1981 GACATAGCAACACTGCATGTATGTTTTTATAAATCAATAAGAGTACATAATTTATTACGT  
 2041 ATCATTTCGGTTTGTAAATATACTGTATACATCATCCACACTATTAGTCAGCACTAGCGCG  
 2101 CGGGCGCACGTTAACAATAGCAGCGTGCCCGTTATCTATATTGTCCGATATTTACACATAA  
 2161 CATTTCATCGACATGATTAAATACCTAAGTACTGCACACAGATGTTTAAATGTATATCGTC  
 2221 ATATAAATTATATCGCTAGGACAGACCCAAACGACCTTTATCCCAAACAGTCAGATCCTC  
 2281 TTCTCAAGTGTGCGATTTCTGTTATGGAATATGCATACCCTGGCCCAGAAATTGCACGCAC  
 265 ThrAspIleGluThrIleSerTyrAlaTyrGlyProGlySerIleAlaArgVal  
 2341 GAGCGTAGTGAATGCGTCATTGGTTTTACATTTAAAGGCTAAATGCACAAATCTTTAGA  
 247 LeuThrThrPheAlaAspAsnThrLysCysLysPheAlaLeuHisValPheGluLysSer  
 2401 CGACAGCACATCGTTAAATAGCATCTCTAGCGTTCTTATGAATGCTAAGCATTGGAGTCC  
 227 SerLeuValAspAsnPheLeuMetGluLeuThrArgIlePheAlaLeuCysGlnLeuGly  
 2461 TCCTGGTCCGCCACAATAACAGCTGAGTATCATACCCTGAGCTCCGGGGTGTGCGCACAT  
 2074 GlyProArgGlyCysTyrCysSerLeuIleMetGlyGlnAlaGlyProAsnAsnCysMet  
 2521 AGCGGATTTCGTATAAACATAGGATTTTCCGCGAATCCATCAGTTGCAAAAATCTGTTAGG  
 187 AlaSerGluTyrLeuCysLeuIleLysArgSerAspMetLeuGlnLeuPheArgAsnPro  
 2581 CTCCATCAACAACGCTGGATTTACTTCAGATCCACGCGTAAAGTAATGGTGCTCGAATAC  
 167 GluMetLeuLeuAlaProAsnValGluSerGlyArgThrPheTyrHisHisGluPheVal  
 2641 CGTTTTTAGAGTTGTGCGCATTTCAAGGAACAAAGAATTCATTTCTTCATTGCAACGACG  
 147 ThrLysLeuThrThrProMetGluLeuPheLeuSerAsnMetGluGluAsnCysArgArg  
 2701 CGCCAGAAATCCCAAGACCTCTTTGGGTAGTATGTTCTTGCCTATAAAACACGGCGTTCC  
 127 AlaLeuPheGlyLeuValGluLysProLeuIleAsnLysGlyIlePheCysProThrGly  
 2761 AAGTGCCAGGAACCACGCATGTGTTACTGTTGGGGCGTATTCAGAAATAAAGCGGGGTTT  
 107 LeuAlaLeuPheTrpAlaHisThrValThrProAlaTyrGluSerIlePheArgProLys  
 2821 ATGCGGCTTTTGAAGCTCGGATATCCAAAGTATCGCTTGCTGATGAACGAGCGATGTAGC  
 87 HisProLysGlnLeuGluSerIleTrpLeuIleAlaGlnGlnHisValLeuSerThrAla  
 2881 TGTTACAAAACCTCCTTTCCATCCTCCAGTCAACATAATATTTATCGGCCTACCTATGTC  
 67 ThrValPheGlyGlyLysTrpGlyGlyThrLeuMetIleAsnIleProArgGlyIleAsp  
 2941 CGTAATAAGTATTTGGTCCGGCAATTATTCGGTATGAGGTCTTGCAAGGAATAAGCTCTTAG  
 47 ThrIleLeuIleProArgAlaIleIleGlyTyrSerThrLysCysSerTyrAlaArgLeu  
 3001 GGACAGCCAGCTTGGATATGGTGCGAAACAGACCTTCTCGGCTTCAGAATGTCGCTCCGC  
 27 SerLeuTrpSerProTyrProAlaPheCysValLysGluAlaGluSerHisArgGluAla  
 3061 AGTCTCTTCGTGTCGGTGCATCTTAGATCCACCATCAATGTGTGCAGCATTGACTCCCGC  
 74 ThrGluGluHisArgHisMet

(Figure 1)

3121 CCGTCGAATATTCTTTTGTACGATGCAGTAATGAGCACGATCATGGGCGGGGCGATGA  
 3181 CGTTCTATTTGCATGTCTGCGAACAATTTGCGTCAGTCATACAGCTATGGAGTGGGCCAT  
 3241 TTCTGGCGTCAACTTAAAAACGCGAACCAGACATATGTATTTGCATGCAAAGACGTAT  
 3301 CTTCTGATTTCTGGGCATCTTCAAATGCTCTGGCCAATATGGCAATGAATTTGGATTCTG  
 3361 TTGACGCCGATGGTATGCAGTGCAAATGTGCCAATAGCCCACATCCGAAAAAGTTATTTG  
 3421 TCATACAAGCAGGTGTTAAGTAGCAATCACATAAAGGCACCAGACGCTCATGGCATCAT  
 3481 AATGAATAGCTCCTTCTCCCCACTGGAACCACTGACAAAATCTGCGAGTATATTCCGCAA  
 3541 ACCACATTTTATTTCTCATAGAACTACCCTAAATCCTTTTAACGGGGAAGAAGAATCCT  
 7554 IleArgLysValProPhePhePheGlyL  
 3601 AGATAGTGCTTGAAGTCATGACTGTTACTGCTGCAATAACACTGTATATTATTTATAAAT  
 7454euTyrHisLysPheAspHisSerAsnSerSerCysTyrCysGlnIleAsnAsnIlePheG  
 3661 TCCGTTTGTCTAGGTATCTGATGTAGGCATTCCGATCCCTTTACTATTGCGTCTTCACGA  
 7254luThrGlnArgProIleGlnHisLeuCysGluSerGlyLysValIleAlaAspGluArgG  
 3721 CCAAATGGGAATGCGCCAAAATCCCCACACCTCATCACCTGGAGGCAGATTGTGTATTA  
 7054lyPheProPheAlaGlyPheAspGlyCysArgMetValArgSerAlaSerGlnThrAsnA  
 3781 TTAATATCCGCCGATTGAAGCACAAAACGGTACGGTACTGTTCTAATTCTGGTATAGAT  
 6854snIleAspAlaSerGlnLeuValPheArgTyrProValThrGlyLeuGluProIleSerG  
 3841 TCTATGGTCAAAAGTCTGCATATCCCCGACATTGCCATGAGATCACACAGTCCAAGTAGC  
 6654luIleThrLeuLeuArgCysIleGlySerMetAlaMetLeuAspCysLeuGlyLeuLeuM  
 3901 ATGTTTATTGAGTCACTCAGACTGTCAACGTCCCTCGCCGACCACCAATCGAAAATAAA  
 6454etAsnIleSerAspSerLeuSerAspValAspArgAlaAlaGlyGlyIleSerPheLeuT  
 3961 GTATCTACGCAAGTTATAGCTCCGCATTTTCTATCGCTAGCAGCAATCGCGACGCAAAAC  
 6254hrAspValCysThrIleAlaGlyCysLysArgAspSerAlaAlaIleAlaValCysPheM  
 4021 ATAAAGGCCATGTTGGGATTTGAACTCTCTGGGGGGCTTGTATCTTCTGCACCGTCGCA  
 6054etPheAlaMetAsnProAsnSerSerGluProProSerThrIleLysGlnValThrAlaT  
 4081 GTCGCAGTTTCCGAAATTTATGTCTAATATATTTTCCGGCCGTGCTCCAATCGGCCGAA  
 5854hrAlaThrLysArgPheLysHisArgIleTyrLysGlyAlaThrSerTrpAspAlaSerP  
 4141 AAGAATCTGCGTATTACCAGACTCATTGACGGGCCGATAAAGACCATAAAACAAATTC  
 5654hePheArgArgIleValLeuSerMetSerProGlyIlePheValMetPheCysPheGluG  
 4201 TGTGCACTCCCTCCAGTTTTCGCTCCGTAAGTCCCGTAACCTTTTTCGCTTTTCG  
 5454lnAlaSerGlyGlyGlyThrLysGlyAspAspLeuAspArgLeuLysLysGlnThrGluL  
 4261 AGGAGCAAGCGTTCGTTATCCCTACCCACACTTGTTTTCCACCGTTTCTTATTATAAGC  
 5254euLeuLeuArgGluAsnAspArgGlyValSerThrLysTrpArgLysArgIleIleLeuP  
 4321 GGTTGTATCGCCAACGCGTCACCGCAGGTTGTACATACAGTGATGGCATACTTGAACGT  
 5054roGlnIleAlaLeuAlaAspGlyCysThrThrValTyrLeuSerProMetSerSerArgA  
 4381 GCAACAACGCGCTCGCTTTGCAAATCTAAGTCATTGACCATCAAATCGCGTTGAGAGGAT  
 4854laValValArgGluSerGlnLeuAspLeuAspAsnValMetLeuAspArgGlnSerSerL  
 4441 AGCCAGGCATCTTTTTTCTAGTATGGTGACGGTGCAGCCACCCCAACTCAGTTCTTGTA  
 4654euTrpAlaAspLysLysArgThrHisHisArgHisLeuTrpGlyLeuGluThrArgThrP  
 4501 AAAAAAGCTATTGGCGGGAATTTATGTTCTGAGGTGCATTCTATATTTATGAGTCCATCA  
 4454hePheAlaIleProProPheLysHisGluSerThrCysGluIleAsnIleLeuGlyAspP  
 4561 AATGCCATTAACCAGATTCTGATTTTTTTCGCTCGACCCGGCATCACTATGGATACAATAC  
 4254heAlaMetLeuTrpIleArgIleLysGluSerSerGlyAlaAspSerHisIleCysTyrA  
 4621 CTTTCTATGGCCATTTTCAGCTCTCGAACCAACCACACGACAATTGACTAACATAAGTA  
 4054rgGluIleAlaTrpLysLeuGluArgValLeuTrpValSerLeuGlnSerValTyrThrH  
 4681 TGATCTTTATCACAGTCGCACCCATCTGAGTTATATTTATGGCATCCGAGCGCTCTTACT  
 3854isAspLysAspCysAspCysGlyAspSerAsnTyrLysHisCysGlyLeuAlaArgValT  
 4741 GTACGGTCCGATACACCCATGGTTTTTCTTTTATATAGTCGGGTTATAGTCTGTGGGTT  
 3654hrArgAspSerValGlyMetThrLysGlyLysTyrLeuArgThrIleThrGlnArgThrG  
 4801 TGGCGGTAGCACGGAGTAGTTTGATTTTAAAGAATCGAAACCGGCTTGGAGAGACCACT  
 3454lnArgTyrCysProThrThrGlnAsnLysLeuIleSerPheArgSerProSerValValT  
 4861 GTCGAATATTTGTCCGTATACTCTACACGTGAGTGTTGTCCATTCTAGGTATATTCATC  
 3254hrSerTyrLysAspThrTyrGluValArgSerHisGlnGlyAsnArgProIleAsnMetG

(Figure 1)

4921 TGTTCCGATACCTTCAATTGCTGTTTCAGGCATAACCTTAAAGCATATGTTATGTTGTACA  
 305 **lnGluSerValLysLeuGlnGlnGluProMetValLysPheCysIleAsnHisGlnValA**  
 4981 TCAAAACTTGGTGAGTTATGTTTCGATTGCCGCGCATAAAGAATCGTACATGAGCGTTTCT  
 285 **spPheSerProSerAsnHisGluIleAlaAlaCysLeuSerAspTyrMetLeuThrGluA**  
 5041 GCTAACATACTATCTATATTCTCACACGCCCTGCATATACTGTTCCATTCCAAATTCA  
 265 **laLeuMetSerAspIleAsnGluCysAlaGlyAlaTyrValThrGlyIleGlyPheGluA**  
 5101 CGTTTTGCCCCATCGGCTATCTGCTCCCAAAAAGTTGTAATATAGGTGCCGCTGGGTGCG  
 245 **rgLysAlaGlyAspAlaIleGlnGluTrpPheThrThrIleTyrThrGlySerProAlaP**  
 5161 AAATTTTCATCAGTTGTATTCTGATAAACTGAATCACTTTACATAATTTTGGCCACATA  
 225 **heAsnGluAspThrThrAsnArgIlePheGlnIleValLysCysLeuLysGlnTrpMetA**  
 5221 TCTGCGTGACCCATAGTATCGAACCCGTTGGGCTCGGAGACGACAGTGCGTACAATGGGT  
 205 **spAlaHisLeuTrpLeuIleSerGlyThrProGluSerValValThrArgValIleProI**  
 5281 ATTTTACCTTTCCCCAACAAAATAATGGTATACAAGTTAGGTCCGTACCTAGACCTTAAT  
 185 **leLysGlyLysGlyLeuLeuIleIleThrTyrLeuAsnProGlyTyrArgSerArgLeuT**  
 5341 GTTTCCAATTCTTCTGAATCACTGCACCTCTCGTAGGGGAGTAACGGTAATAATTTCTGCT  
 165 **hrGluLeuGluGluSerAspSerCysGluArgLeuProThrValThrIleIleGluAspA**  
 5401 CTGAGCCCCGTTTTGCGTTGAAAACATAACATTAGATAATGTGCAATCGGTTTTCTTTT  
 145 **rgLeuGlyThrLysArgGlnPheSerIleValAsnSerLeuThrCysAspThrGluLysI**  
 5461 ATCCGGATACATCTAAGTATTATGACATCGGTGGTCATTGTTTCCATCAACGACCATCTT  
 125 **leArgIleCysArgLeuIleIleValAspThrThrMetThrGluMetLeuSerTrpArgL**  
 5521 TTACGATCGCCCATACTACTCATGGACGTTGTCTGGTGTGAAAAATCACCAGAATTGCAA  
 105 **ysArgAspGlyMetSerSerMetSerThrThrProThrSerPheAspGlySerAsnCysA**  
 5581 CGGATCTCTGGGTACCATGCTGCTGATGGAATTGGCGGTTTTAATTGTTGTTTTCAGTCTA  
 85 **rgIleGluProTyrTrpAlaAlaSerProIleProProLysLeuGlnGlnLysLeuArgA**  
 5641 TTATTGCTATCTTTGGCGGGGTTGAATAATGTGGGGGAGAGTGATTGCAGGAATCCGAA  
 65 **snAsnSerAspLysAlaProAsnPheLeuThrProProSerHisAsnCysSerAspSerH**  
 5701 TGGGTCAATAAAACGACCGTGCTCCGTTCTGCCGGCGCCGATCCGATTGAAGCTATATAC  
 45 **isThrLeuLeuValValThrSerArgGluAlaProAlaSerGlyIleSerAlaIleTyrL**  
 5761 TTCGCTTCTCTCCCCACTTTTCCAATTTGATCCGGAAATAAAACGGCCCCGGACAACAGT  
 25 **ysAlaGluArgGlyValLysGlyIleGlnAspProPheLeuValAlaGlySerLeuLeuI**  
 5821 ATCGTACGATCCGGATCC  
 54 **leThrArgAspProAsp**



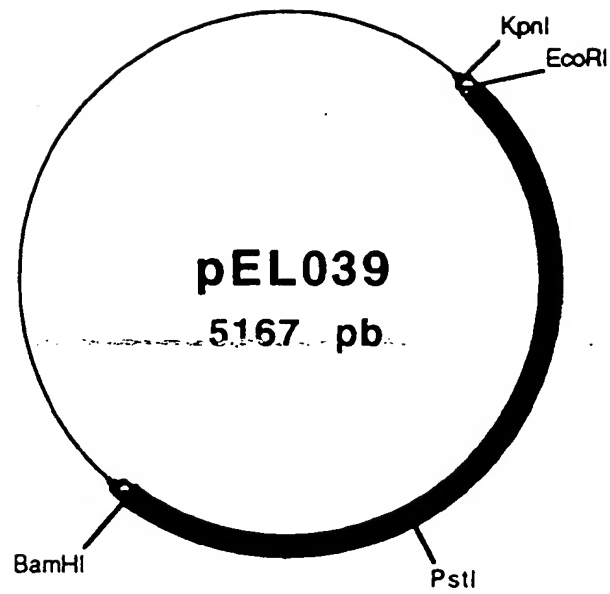
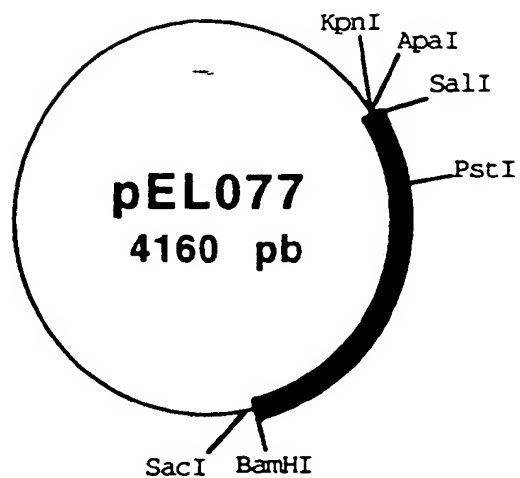
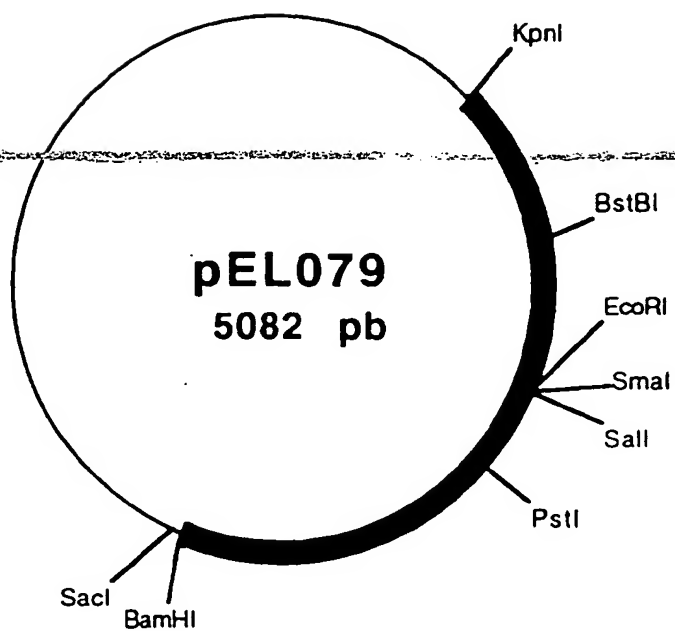


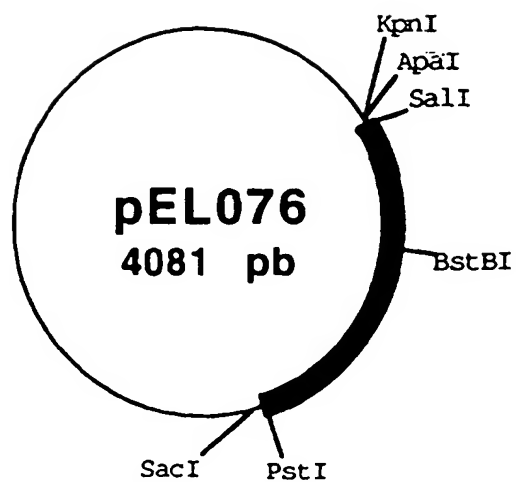
Figure 2



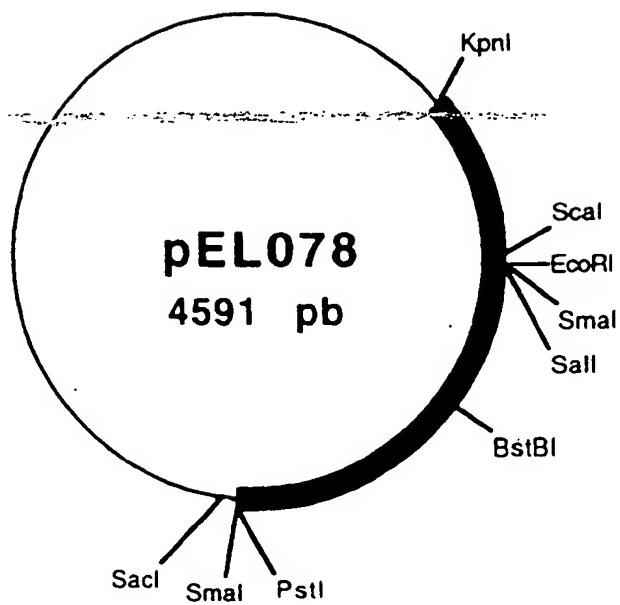
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

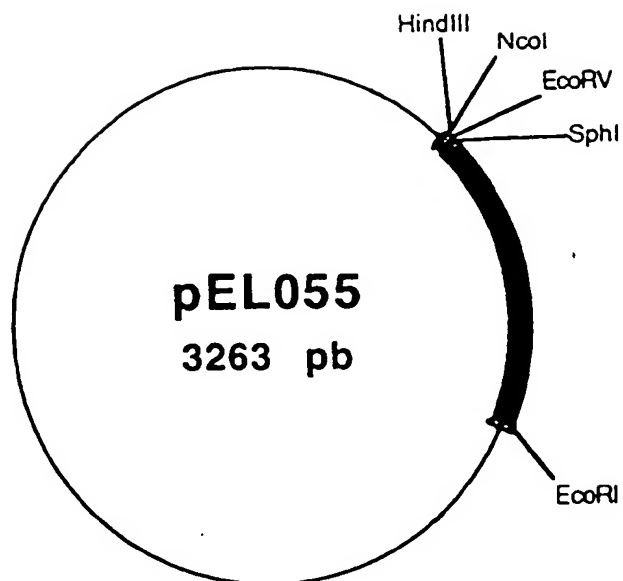


Figure 8

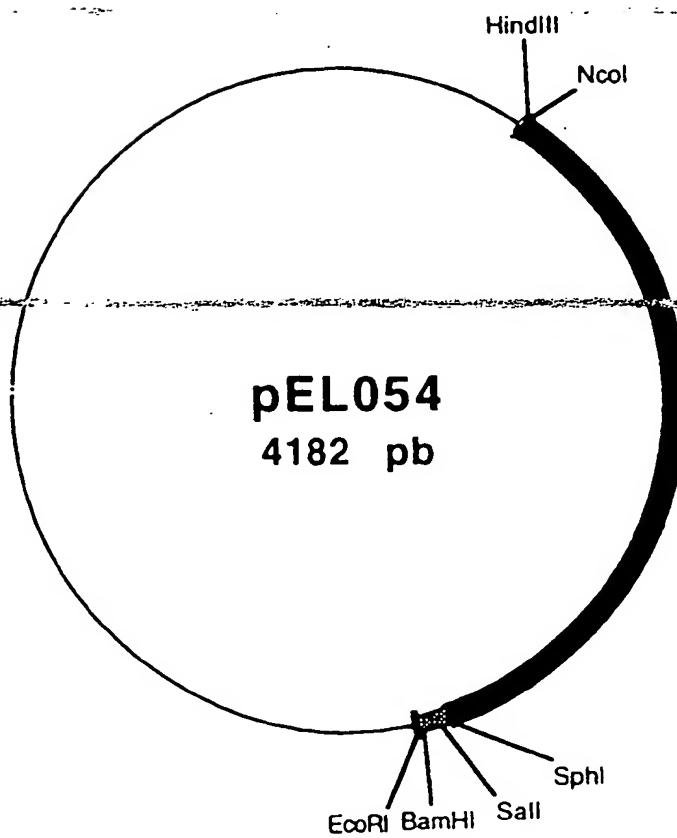


Figure 7

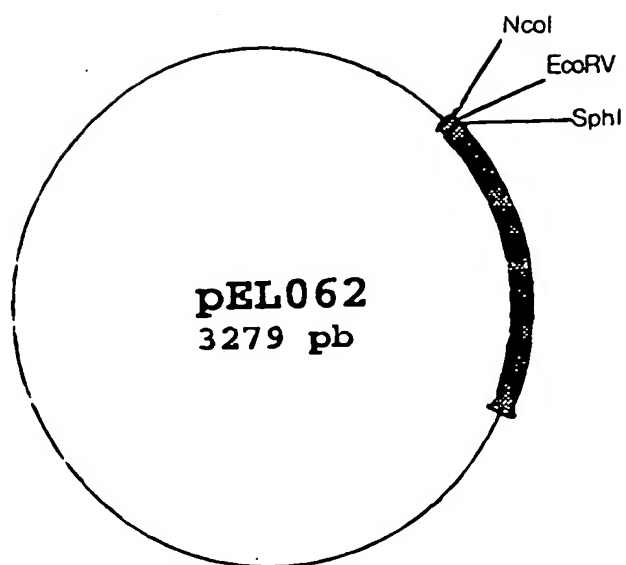


Figure 9

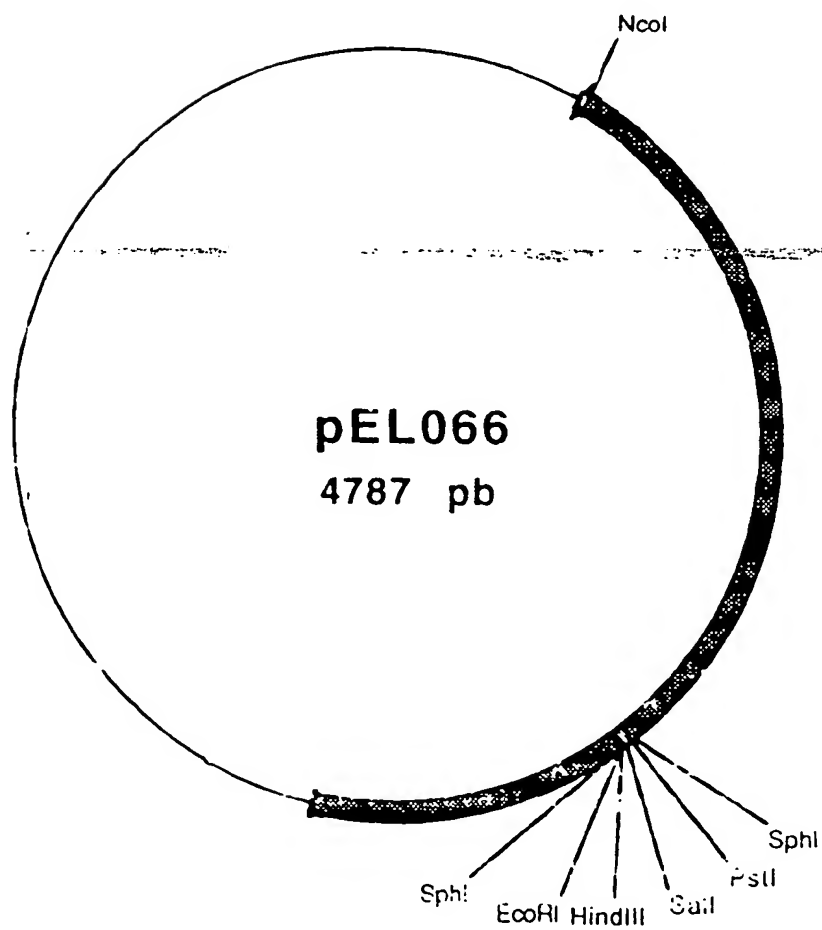


Figure 10

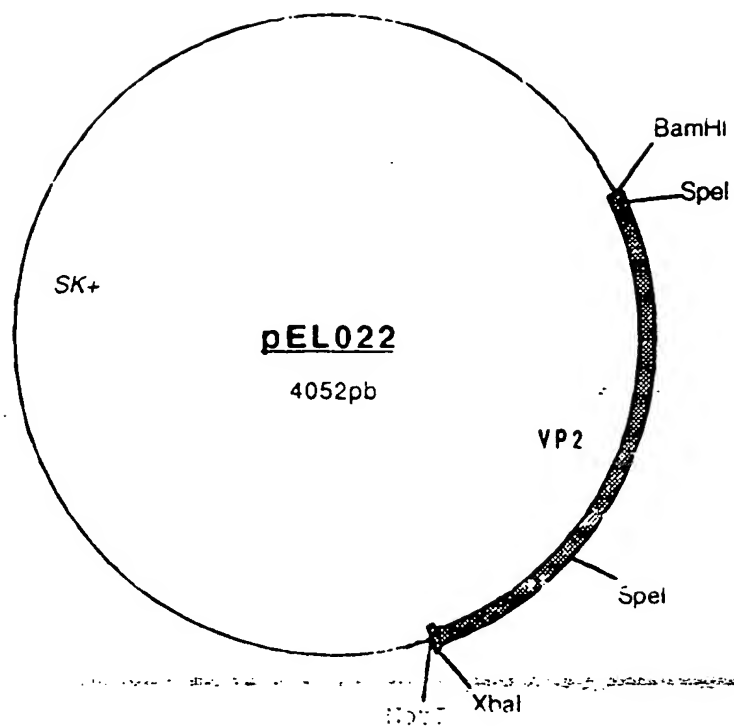


Figure 11

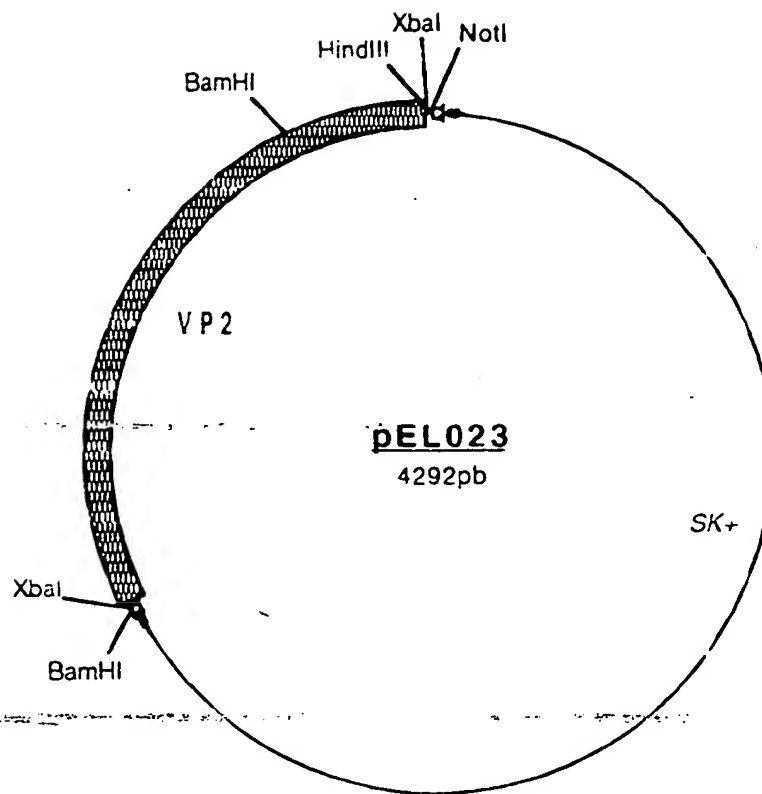


Figure 12



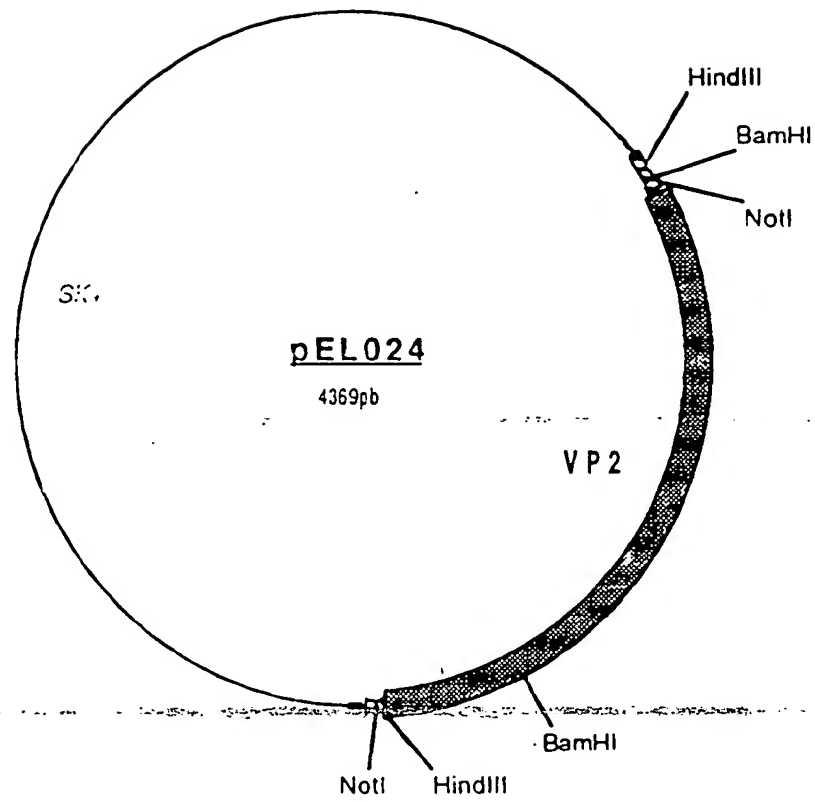


Figure 13

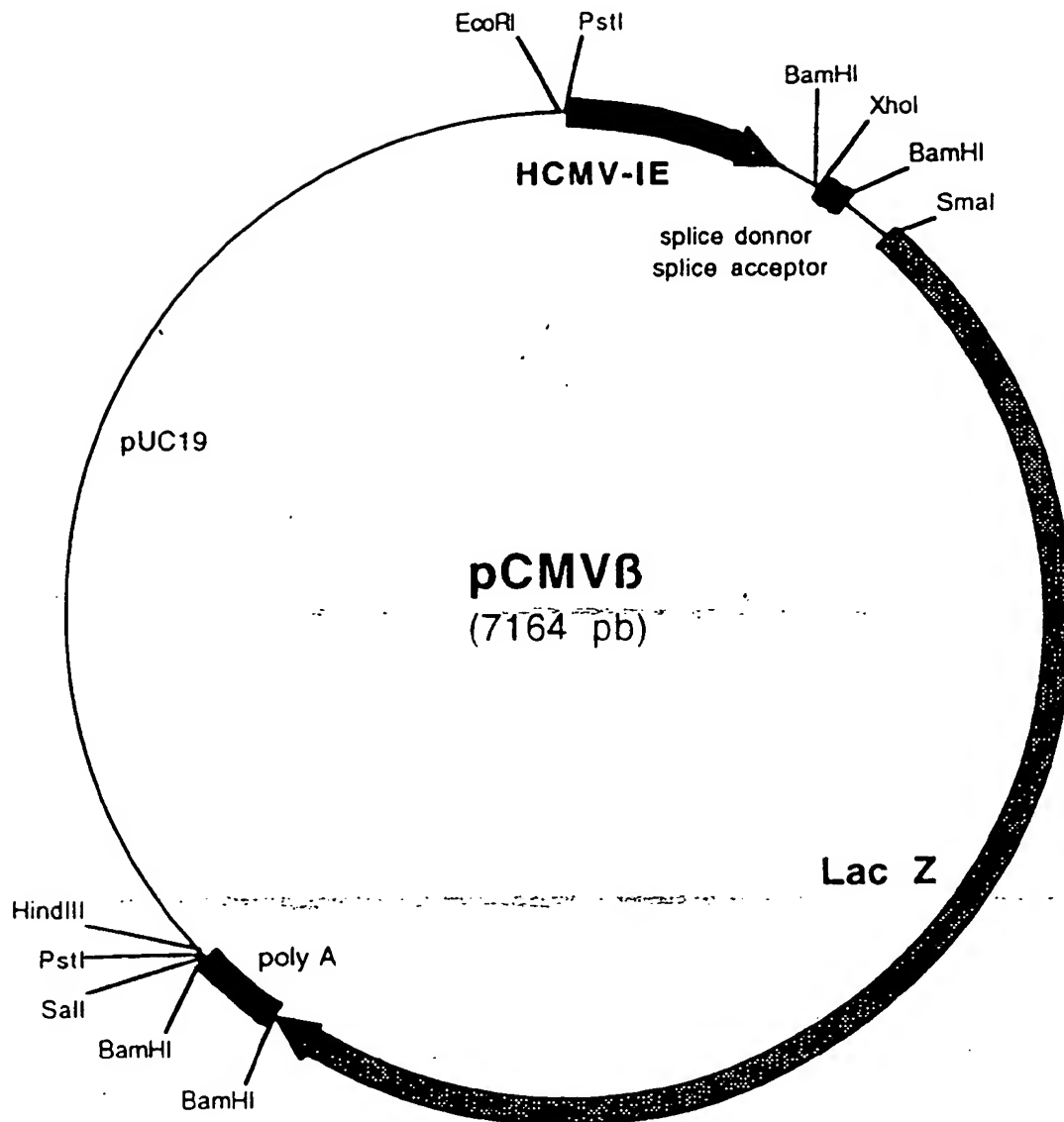


Figure 14

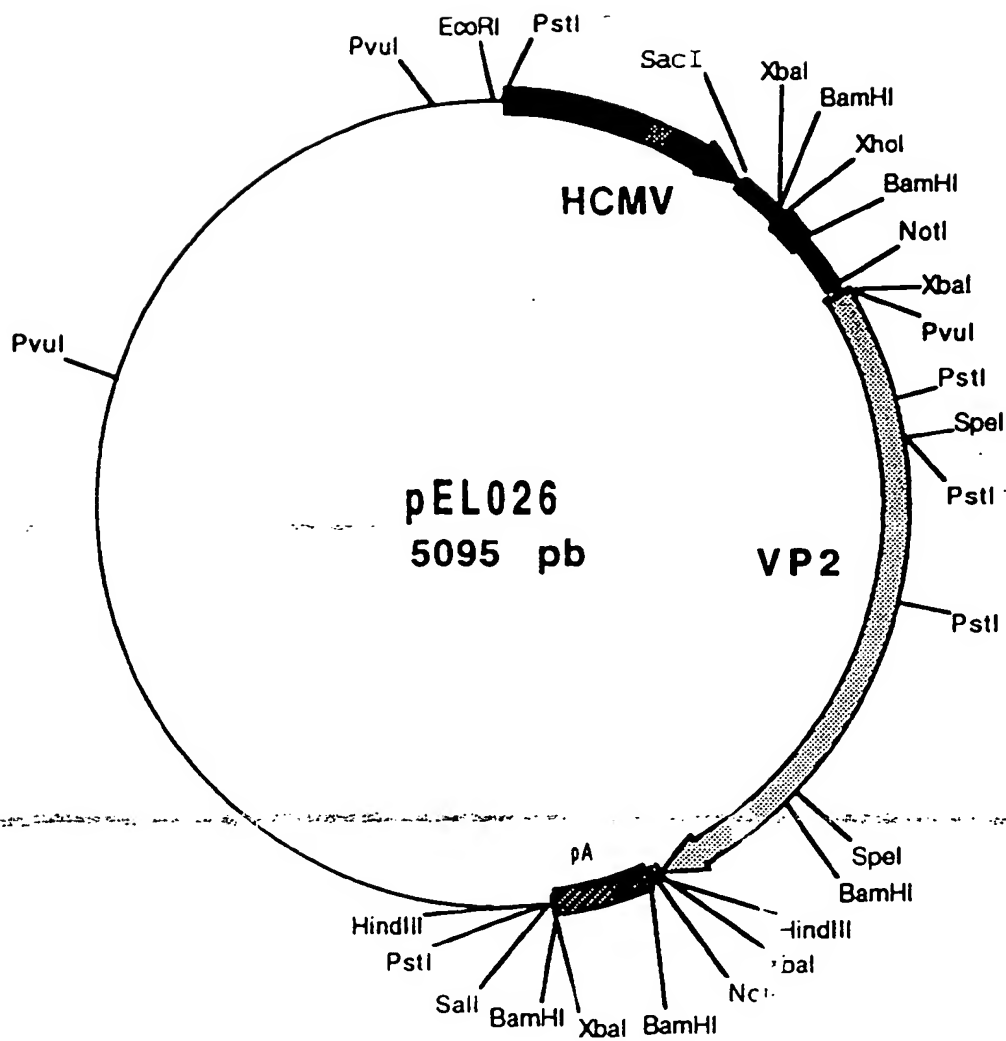


Figure 15

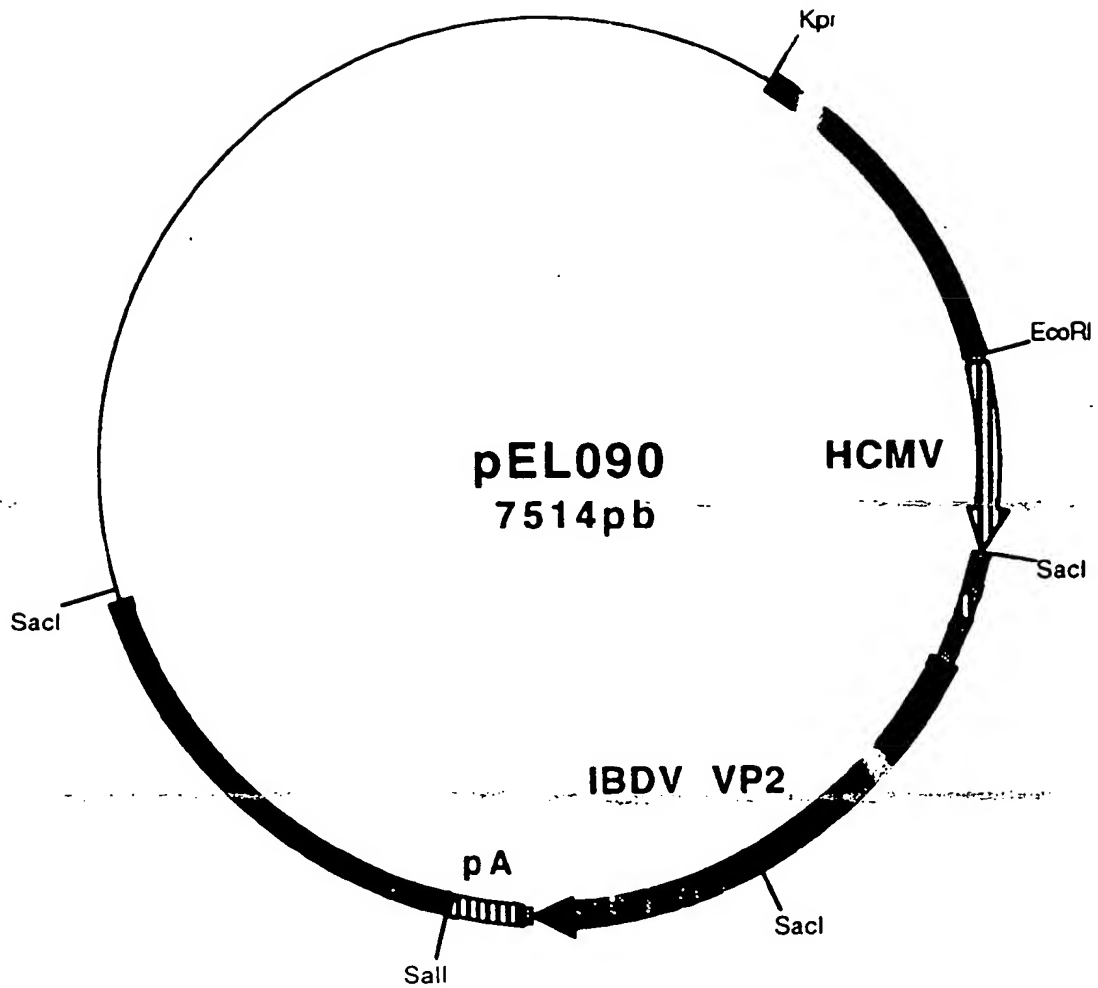


Figure 16

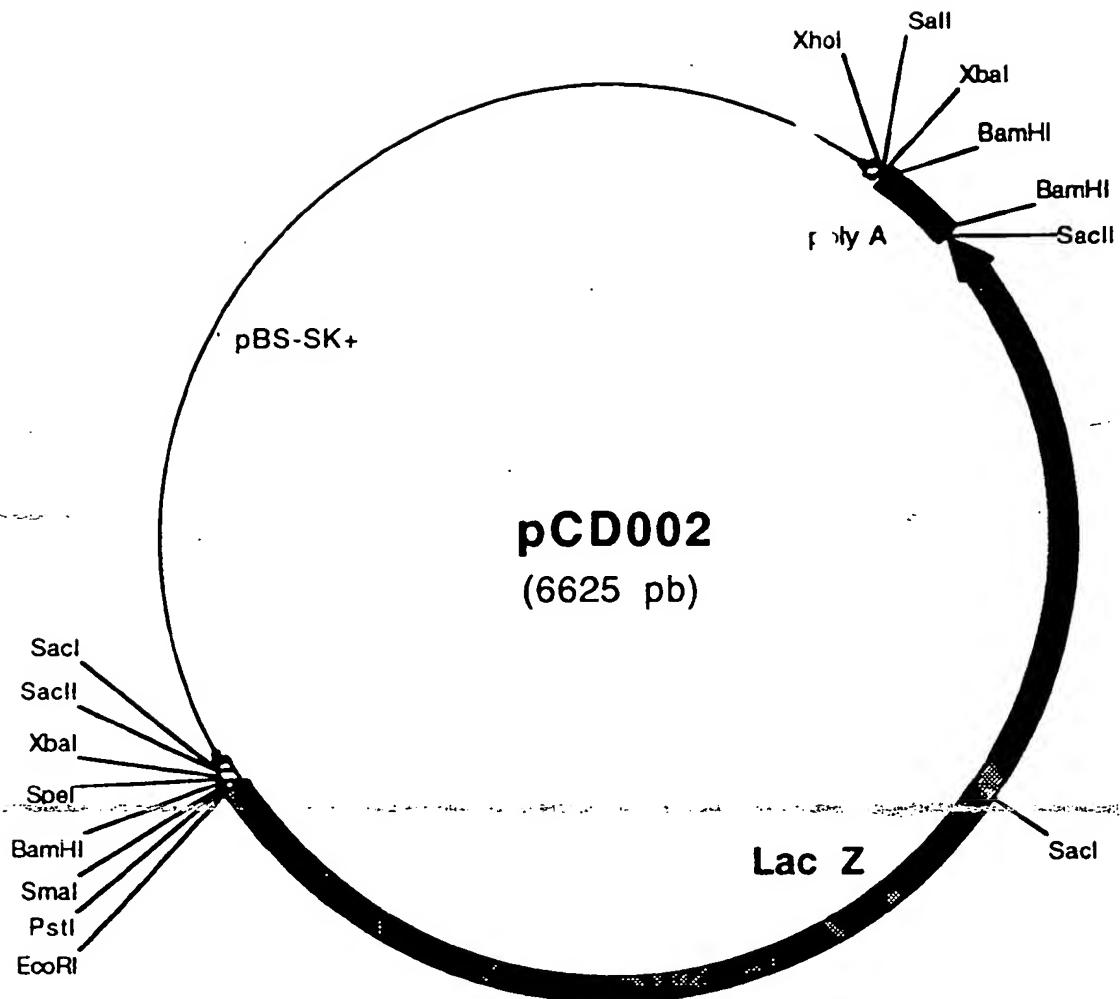


Figure 17

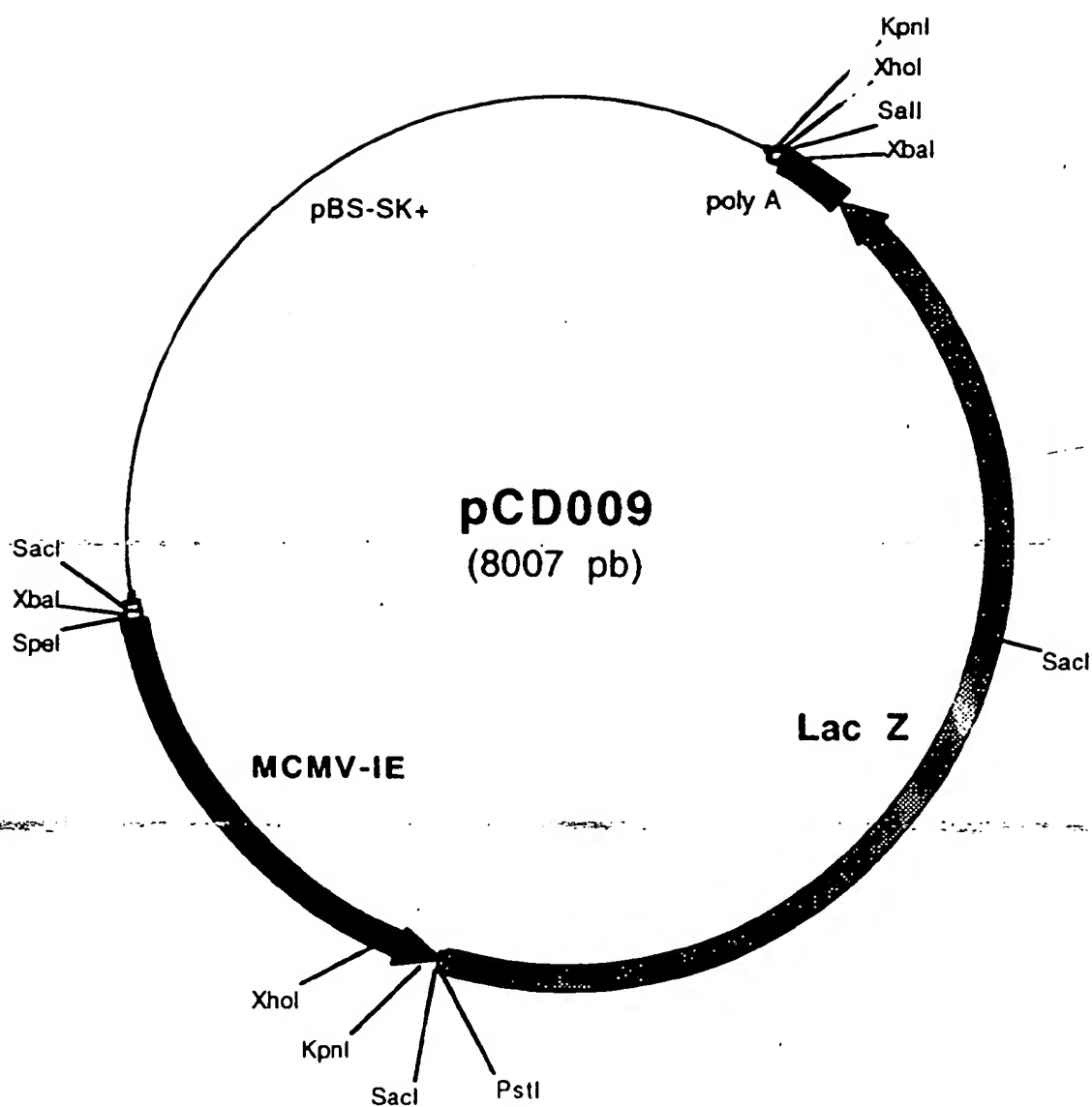


Figure 18

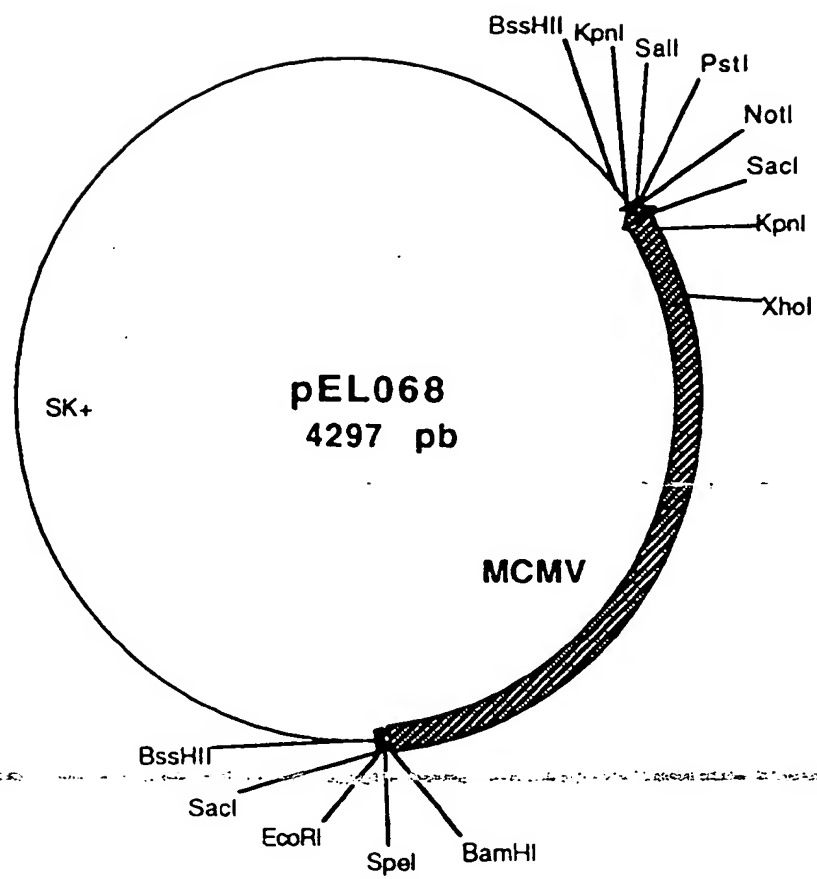


Figure 19



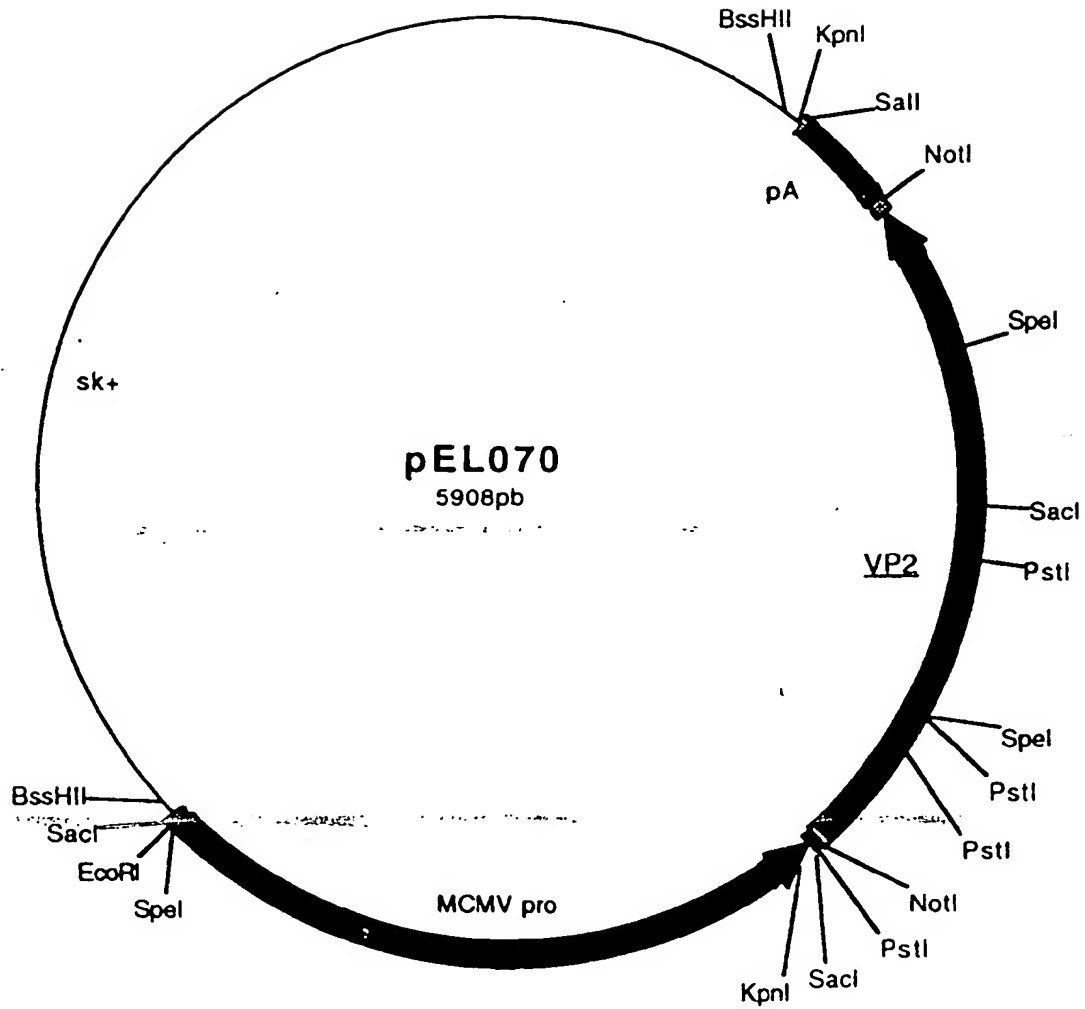


Figure 20

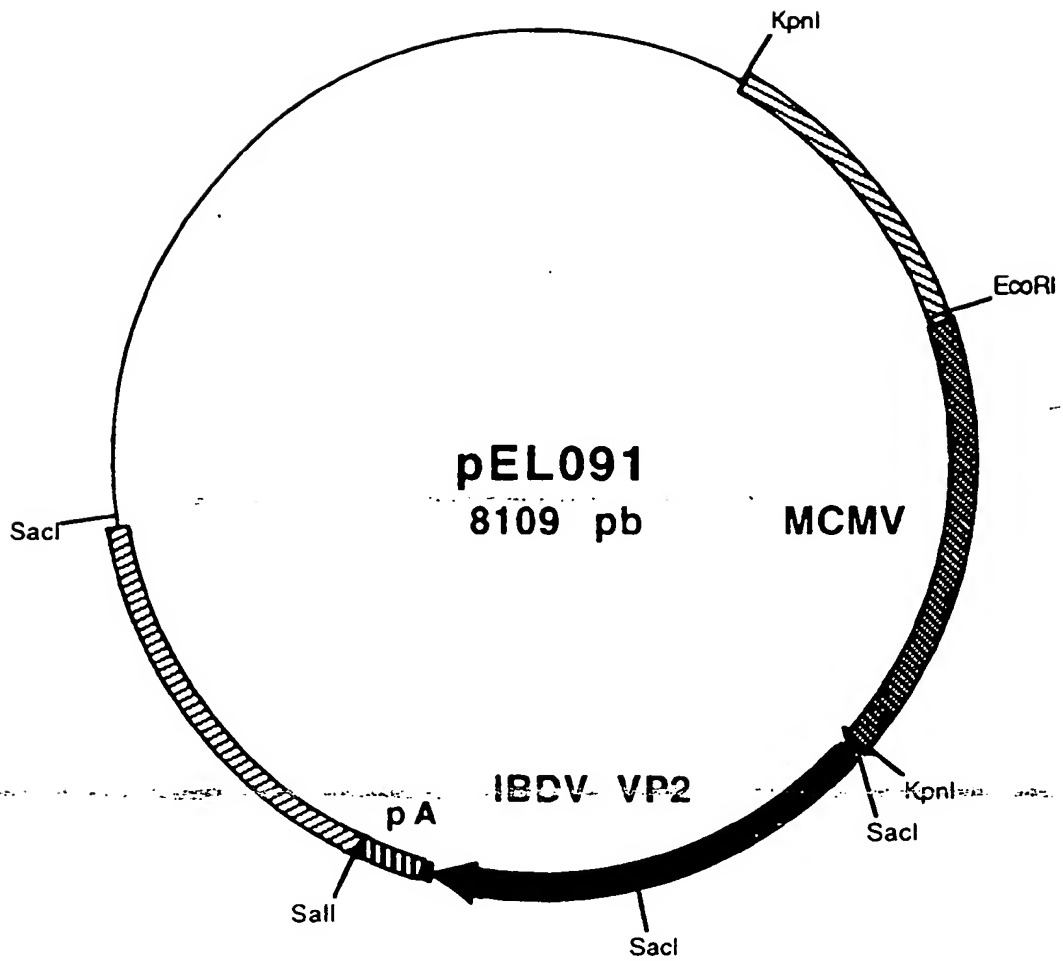


Figure 21

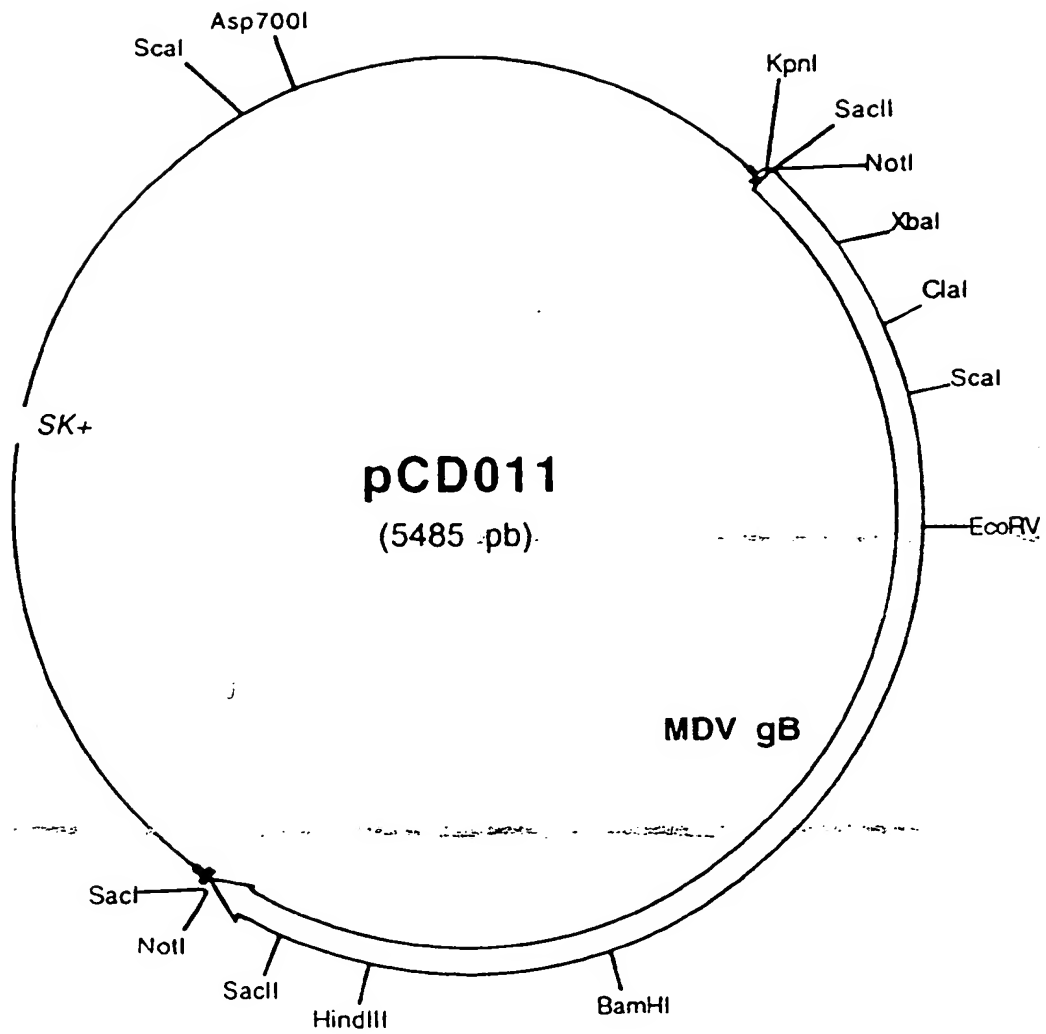


Figure 22

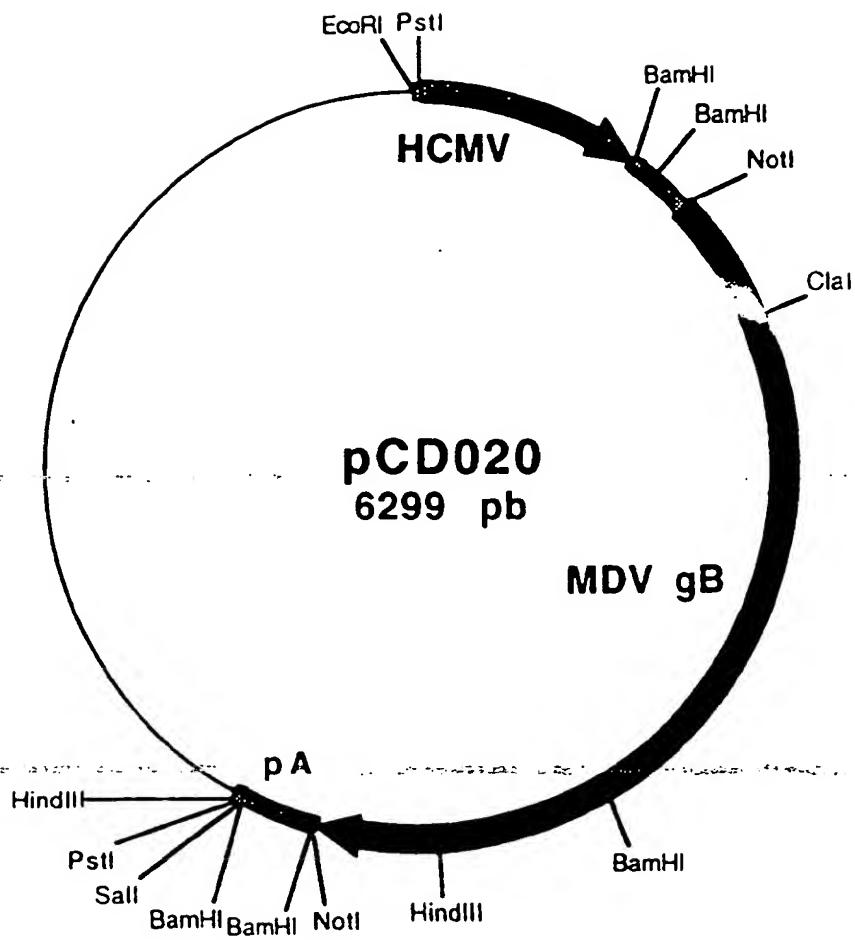


Figure 23

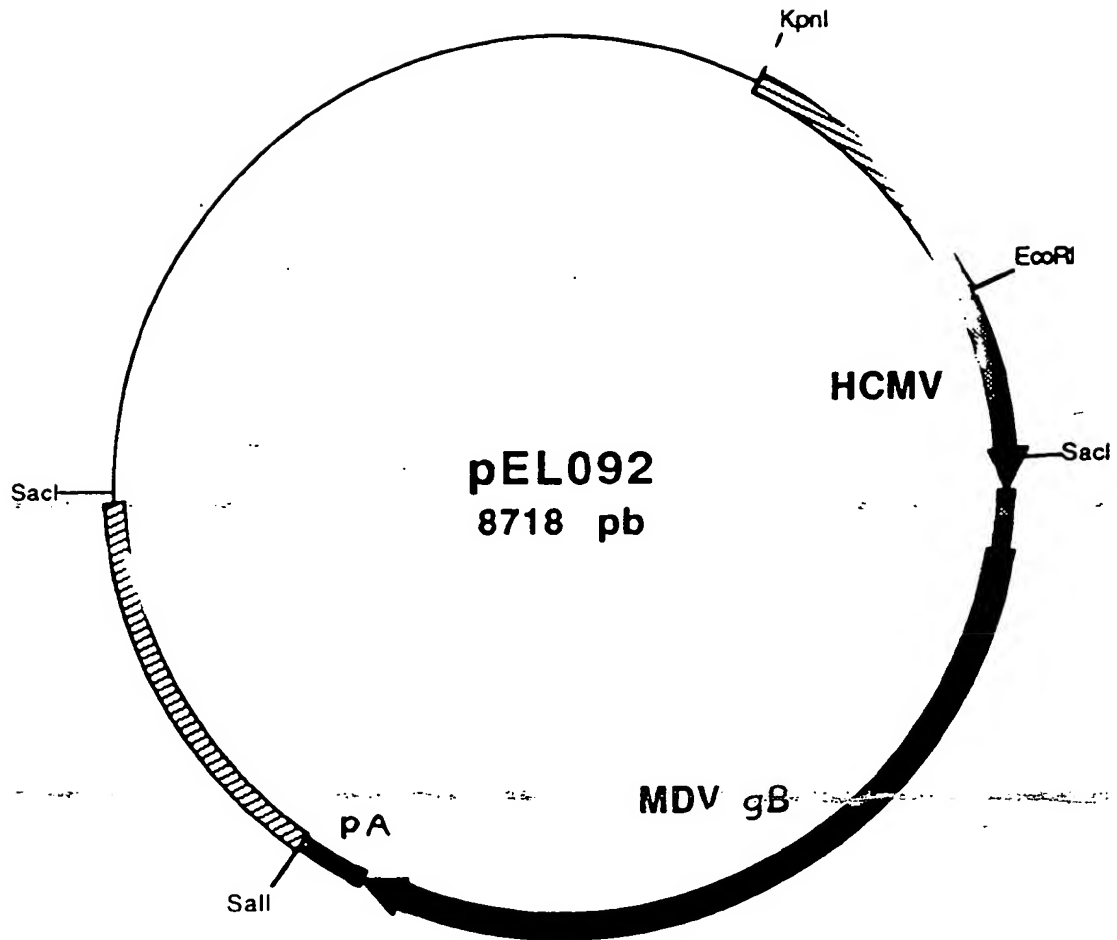


Figure 24

1 TGCTACCTGATGTACAAGCAAAAGGCACAACAAAAGACCTTGTTATGGCTTGGGAATAAT  
 61 ACCCTTGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATATGAATACAAACGAGAGGCGGAGGTATC  
 121 CCCAATAGCAATTTGCGTGTAATTCTGGCAACCTGTTAATTAGAAGAATTAAGAAAAA  
 181 CCACTGGATGTAAGTGACAAACAAGCAATACACGGGTAGAACGGTCGGAGAAGCCACCCC  
 241 TCAATCGGGAATCAGGCCTCACAACGTCCTTTCTACCGCATCATCAATAGCAGACTTCGG  
 301 TCATGGACCGTGCAAGTTAGCAGAGTTGCGCTAGAGAATGAAGAAAGAGAAGCAAAGAATA  
 1MetAspArgAlaValSerArgValAlaLeuGluAsnGluGluArgGluAlaLysAsnT  
 361 CATGGCGCTTTGTATTCCGGATTGCAATCTTACTTTTAATAGTAACAACCTTAGCCATCT  
 20hrTrpArgPheValPheArgIleAlaIleLeuLeuLeuIleValThrThrLeuAlaIleS  
 421 CTGCAACCGCCCTGGTATATAGCATGGAGGCTAGCACGCCTGACCTTGTTGGCATA  
 40erAlaThrAlaLeuValTyrSerMetGluAlaSerThrProGlyAlaLeuValGlyIleP  
 481 CGACTATGATCTCTAAGGCAGAAGAAAAGATTACATCTGCACTCACTCTAATCAAGATG  
 60roThrMetIleSerLysAlaGluGluLysIleThrSerAlaLeuSerSerAsnGlnAspV  
 541 TAGTAGATAGGATATATAAGCAGGTGGCCCTTGAGTCTCCATTGGCGTCTCTAAACACTG  
 80alValAspArgIleTyrLysGlnValAlaLeuGluSerProLeuAlaLeuLeuThrG  
 601 AATCTGTAATTATGAATGCAATAACGTCTCTCTCTTATCAAATCAATGGAAGTGCAAATA  
 100luSerValIleMetAsnAlaIleThrSerLeuSerTyrGlnIleAsnGlyAlaAlaAsnA  
 BspHI  
 661 ATAGCGGGTGTGGGGCACCTGTTTCATGACCCAGATTATATCGGGGGGATAGGCAAGAAGC  
 120enSerGlyCysGlyAlaProValHisAspProAspTyrIleGlyGlyIleGlyLysGluL  
 721 TTATTGTGGATGACGCTAGTGATGTCTCATCTCTATCCCTCTGCGTTCCAAGAACACC  
 140euIleValAspAspAlaSerAspValThrSerPheTyrProSerAlaPheGlnGluHisL  
 781 TGAACCTTTATCCCGGCACCTACTACAGGATCAGGTTGCACTCGGATACCCTCTTTCGACA  
 160euAsnPheIleProAlaProThrThrGlySerGlyCysThrArgIleProSerPheAspI  
 841 TAAGCGCTACCCACTACTGTACTCACAATGTGATATTATCTGGTTGCAGAGATCACT  
 180leSerAlaThrHisTyrCysTyrThrHisAsnValIleLeuSerGlyCysArgAspHisS  
 901 CACACTCATATCAGTACTTAGCACTTGGCGTGCTTCGGACATCTGCAACAGGAGGGTAT  
 200erHisSerTyrGlnTyrLeuAlaLeuGlyValLeuArgThrSerAlaThrGlyArgValP  
 961 TCTTTTACTCTGCGTTCCATCAATTTGGATGACAGCCAAAATCGGAAGTCTTGCAGTG  
 220hePheSerThrLeuArgSerIleAsnLeuAspAspSerGlnAsnArgLysSerCysServ  
 1021 TGAGTGCAATCCCTTAGGTTGTGATATGCTGTGCTCTAAATCAAGAGACTGAGGAAG  
 240alSerAlaThrProLeuGlyCysAspMetLeuCysSerLysIleThrGluThrGluGluG  
 Cial  
 1081 AGGATTATAGTTCAAATCGCTACATCGATGGTGCATTAAGGTTAGGGTTTGACGGTC  
 260luAspTyrSerSerIleThrThrSerMetValHisGlyArgLeuGlyPheAspGlyG  
 1141 AATACCATGAGAAGGACTTAGACGTCATAACTTTATTTAAGGATTGGGTGGCAAATTACC  
 280lnTyrHisGluLysAspLeuAspValIleThrLeuPheLysAspTrpValAlaAsnTyrP  
 1201 CAGGAGTGGGGGGTGGGTCTTTTATTAACAACCGCGTATGGTTCCAGTCTACGGAGGGC  
 300roGlyValGlyGlyGlySerPheIleAsnAsnArgValTrpPheProValTyrGlyGlyL  
 1261 TAAAACCCAATTTCGCTAGTGACACCGCACAAGAAGGGAGATATGTAATATACAAGCGCT  
 320euLysProAsnSerProSerAspThrAlaGlnGluGlyArgTyrValIleTyrLysArgT  
 1321 ACAATGACACATGCCAGATGAACAAGATTACCAGATTCCGATGGCTAAGTCTTCATATA  
 340yrAsnAspThrCysProAspGluGlnAspTyrGlnIleArgMetAlaLysSerSerTyrL  
 1381 AGCCTGGGCGGTTTGGTGGAAAACGCGTACAGCAGGCCATCTTATCTATCAAGGTGTCAA  
 360ysProGlyArgPheGlyGlyLysArgValGlnGlnAlaIleLeuSerIleLysValSert  
 1441 CATCTTTGGGCGAGGACCCGGTGCTGACTGTACCGCCTAATACAATCACACTCATGGGGG  
 380hrSerLeuGlyGluAspProValLeuThrValProProAsnThrIleThrLeuMetGlyA  
 1501 CCGAACGGAGAGTTCTCACAGTAGGGACATCTCATTCTTGTACCAGCGAGGGTCTTCAT  
 400laGluArgArgValLeuThrValGlyThrSerHisPheLeuTyrGlnArgGlySerSert

Figure 25

( Figure 25 )

1561 ACTTCTCTCCTGCTTTATTATACCCTATGACAGTCAACAACAAAACGGCTACTCTTCATA  
 420 ▶ yrPheSerProAlaLeuLeuTyrProMetThrValAsnAsnLysThrAlaThrLeuHisS  
 1621 GTCCTTACACATTCAATGCTTTCACTAGGCCAGGTAGTGTCCCTTGTCAGGCATCAGCAA  
 440 ▶ erProTyrThrPheAsnAlaPheThrArgProGlySerValProCysGlnAlaSerAlaA  
 1681 GATGCCCCAACTCATGTGTCACTGGAGTTTATACTGATCCGTATCCCTTAGTCTTCCATA  
 460 ▶ rgCysProAsnSerCysValThrGlyValTyrThrAspProTyrProLeuValPheHisA  
  
 1741 GGAACCATACCTTGCGGGGGGTATTTCGGGACAATGCTTGATGATGAACAAGCAAGACTTA  
 480 ▶ rgAsnHisThrLeuArgGlyValPheGlyThrMetLeuAspAspGluGlnAlaArgLeuA  
 PstI  
 1801 ACCCTGTATCTGCAGTATTTGATAACATATCCCGCAGTCGC. TAACCCGGGTAAGTTCAA  
 500 ▶ snProValSerAlaValPheAspAsnIleSerArgSerArgIleThrArgValSerSerS  
 1861 GCCGTACTAAGGCAGCATAACGACATCGACATGTTTTAAAGTTCTCAAGACCAATAAAA  
 520 ▶ erArgThrLysAlaAlaTyrThrThrSerThrCysPheLysValValLysThrAsnLysT  
 1921 CATATTGCCTCAGCATTGCAGAAATATCCAATACCCTCTTCGGGGAATTCAGGATCGTTC  
 540 ▶ hrTyrCysLeuSerIleAlaGluIleSerAsnThrLeuPheGlyGluPheArgIleValP  
 1981 CTTTACTAGTTGAGATTCTCAAGGATGATGGGATTTAAGAAGCCAGGTCTGGCCAGTTGA  
 560 ▶ roLeuLeuValGluIleLeuLysAsp  
 2041 GTCAACTGCGAGAGGGTCGGAAAGATGACATTGTGTACCTTTTTTTTGT. ATGCCAAGG  
 2101 ATCAAACCTGGATACCGGCGCGAGCCCGAATCCTATGCTGCCAGTCAGCCATATCAGATA  
 2161 GTACTAATATGATTAGTCTTA. TCTTGTCGATAGTAACTTGGTTAAGAAA. AATATGAGT  
 2221 GGTAGTGAGATACACAGCTAAACAACCTCACGAGAGATAGCACGGGTAGGATATGGCGAGC  
 2281 TCCGGTCCCGAAAGGGCAGAGCATCAGATTATCCTACCAGAGTCACATCT. TCCTCACCA  
 2341 TT. CTCAAGCACAACTGCTCTATTACTGGAAATTAACCTGGCGTACCGCT. CTGACGAA  
 2401 TG. ACTTCGACCACCTCATTATCAGCCGACAATGGAAGAAAATACTTGA. TCGGCCACT  
 2461 CC. TCACTGAGAGGATGATAAAGCTCGGGCGGGCAGTACACCAGACTC. TGACCACCGC  
 2521 C



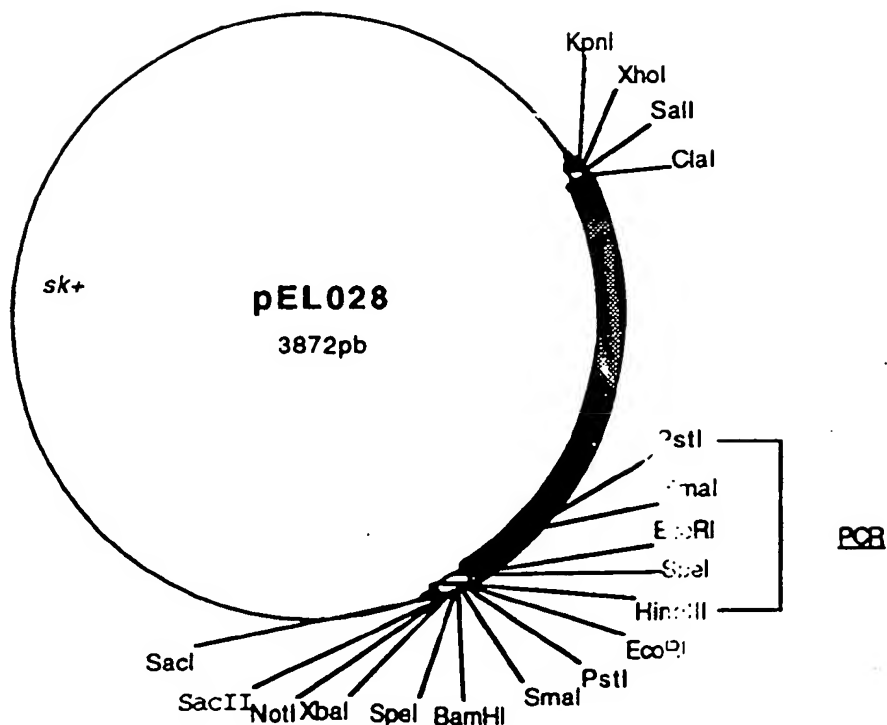


Figure 26

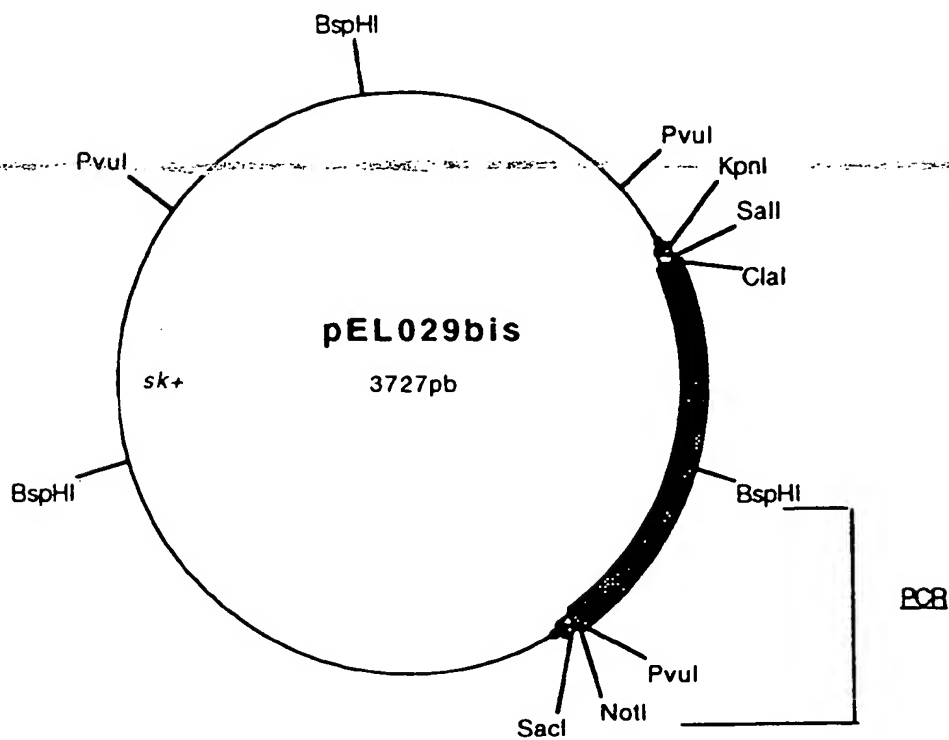


Figure 27

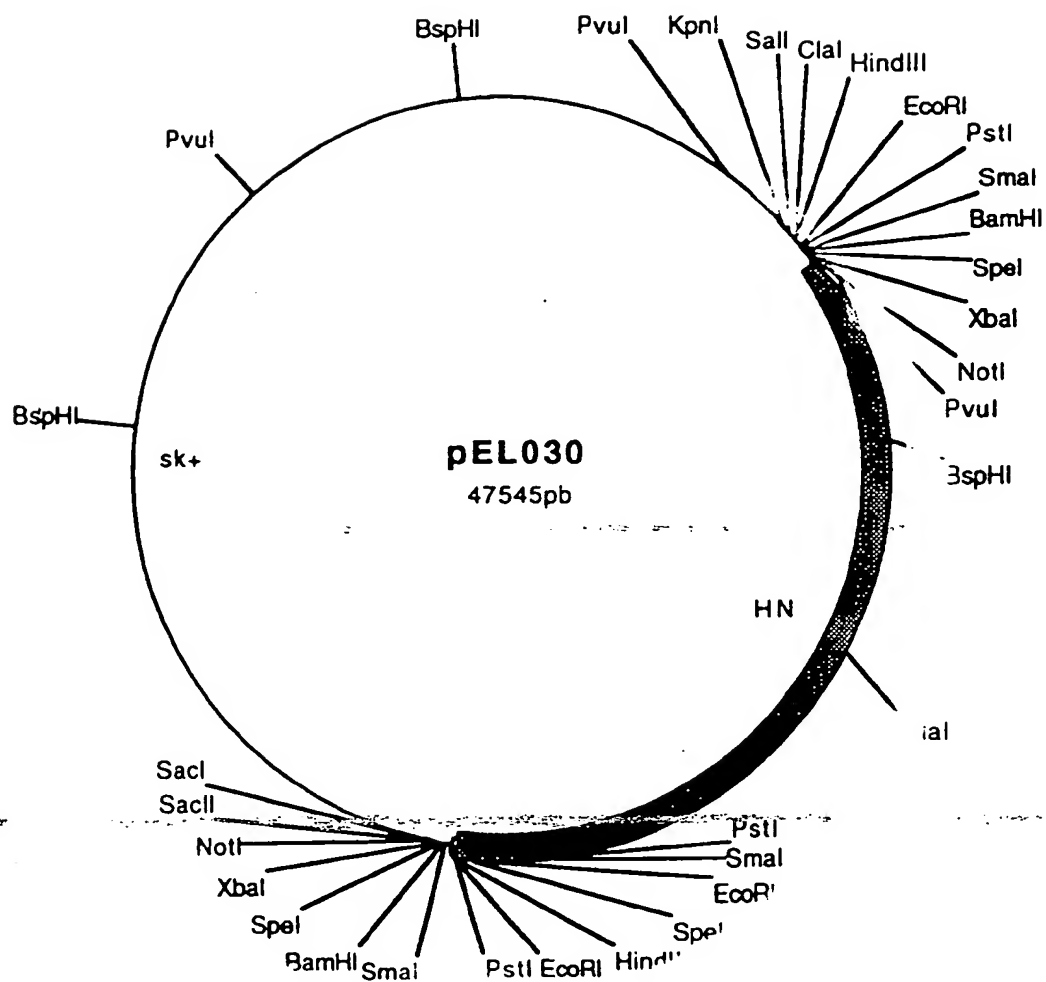


Figure 28

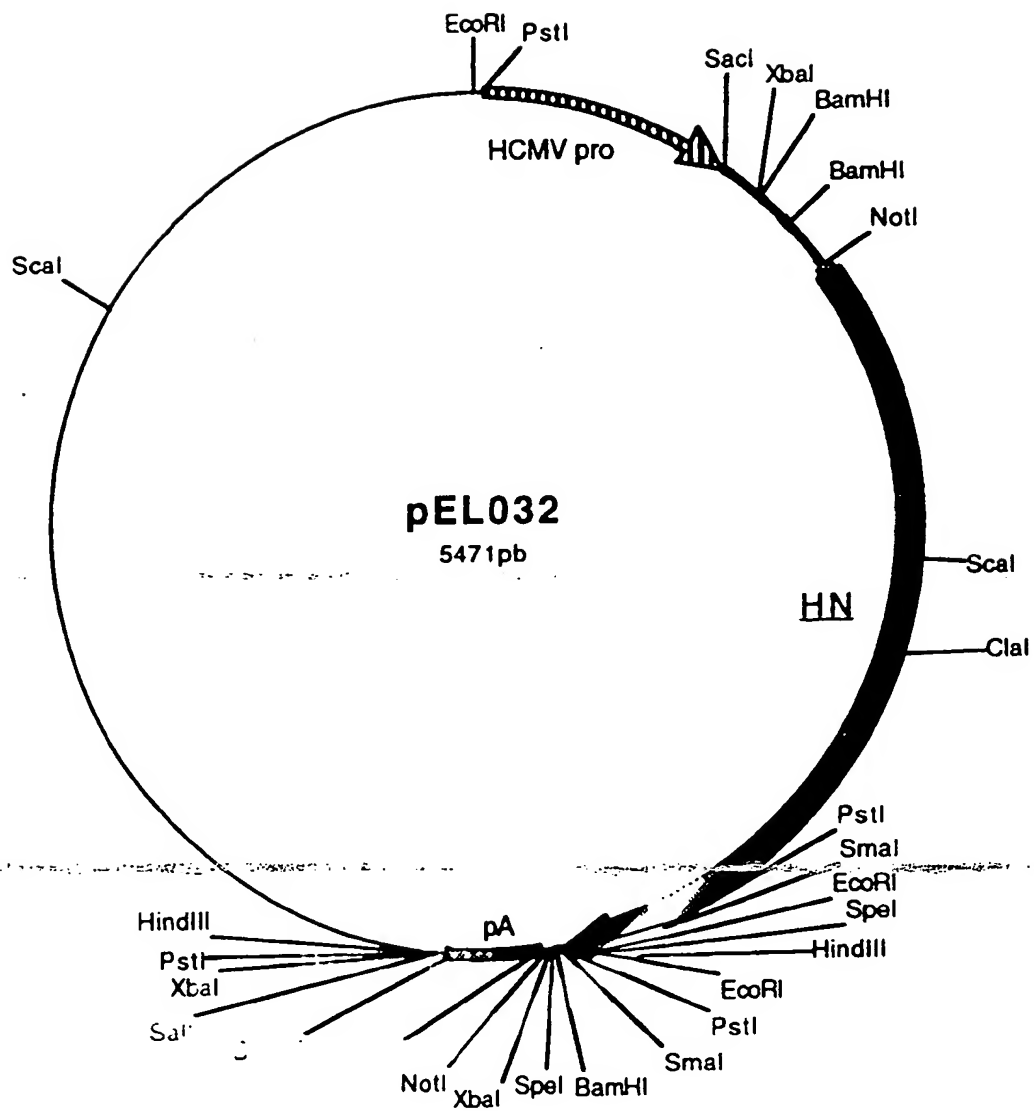


Figure 29

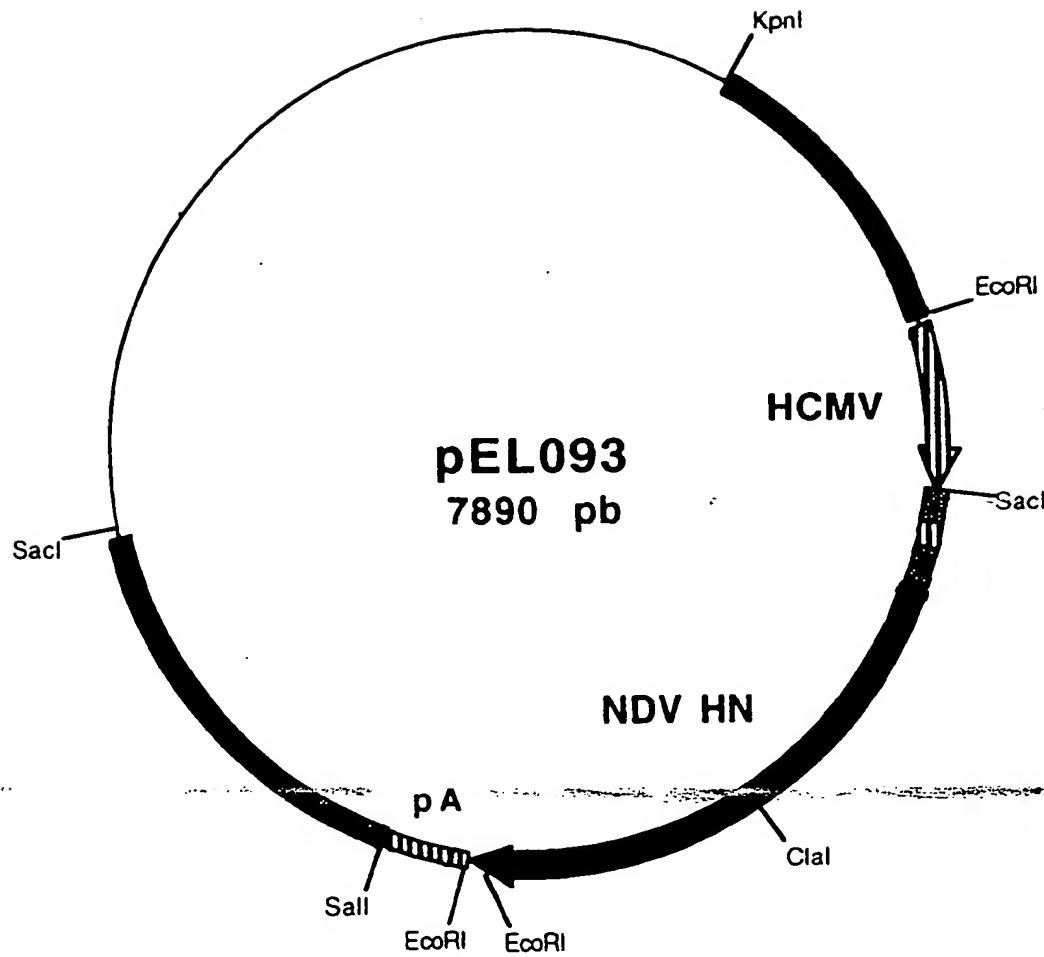


Figure 30

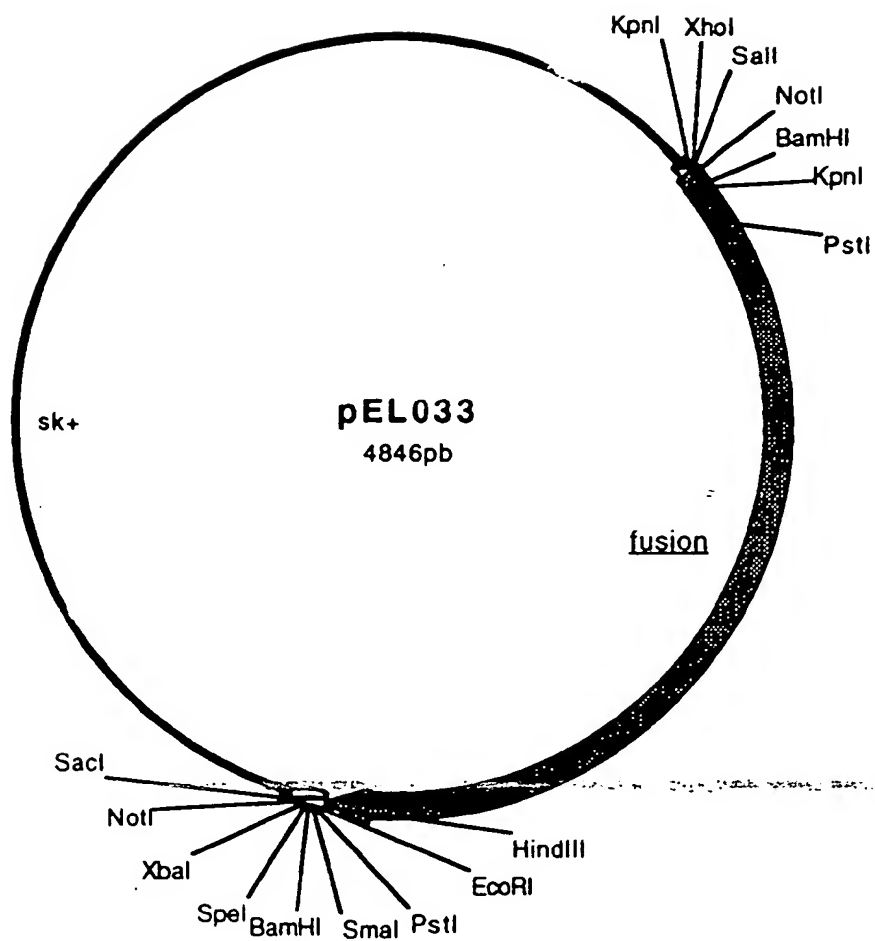


Figure 31

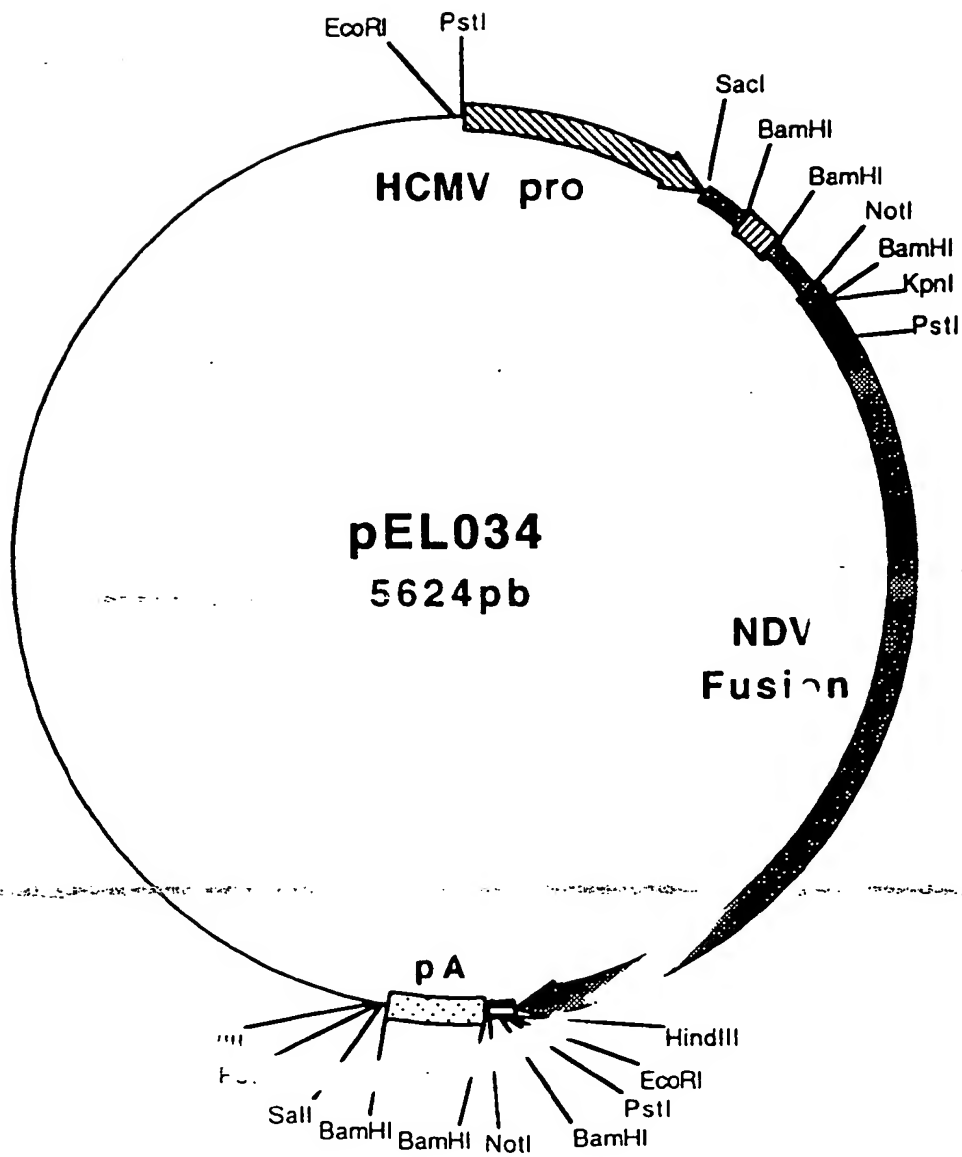


Figure 32

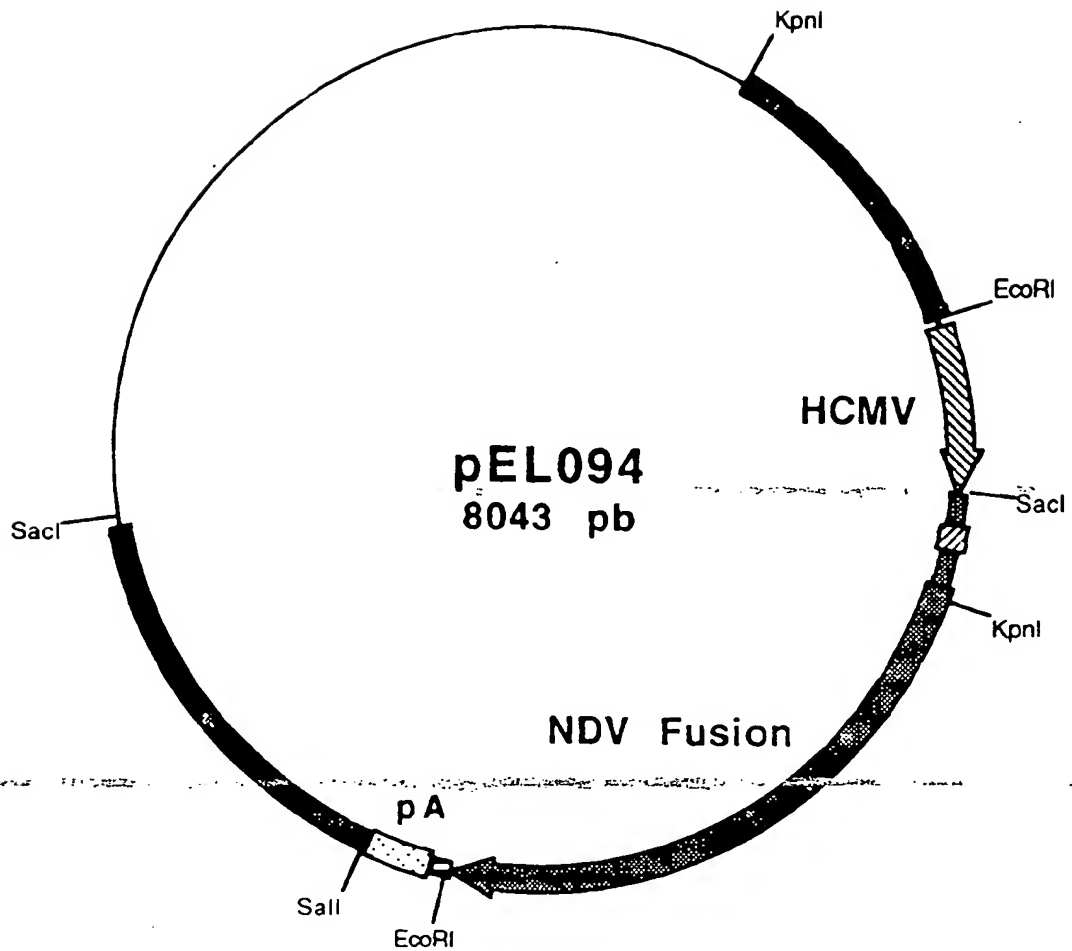


Figure 33

10 20 30 40 50 60  
1 GAATTCATCACCCCCTGCCGATCTTGACGCGGGGACGAGCAAAGCGTGCGGTGCGGGC  
61 AGAAAGACAAGGATGGCTGTGGGTTGAAAGATGAAAAACAAATCGCGGTTGTGGGTCATG  
121 AGTGAGGGAGGGTGCCATCTGTGATGCCGAGAGGTCAAACATGTTATAAAGAAAAACG  
181 ATGGGTGGGAAATATAATAAAGCAACCGAAATGGTACATAAAACTAAAAATACCTACAC  
241 GGTTACACCACCGATCAGGCGAAGAAGTTCCAAACGATTAACAACCGGGACGAGACGTTG  
301 CCGTTCGATCCAGGTCTCTGCTTTTTTGTATCTCTTATCCTATACCGCCGCCTCCCGTCC  
361 GACGAGAGCAAGTCGCACCGCCACTCGAGGCCACAAGAAATTACGATTCTTATACGGGTG  
421 GCGTACCGCCTACTCGAACTATCACGTGATGTGTATGCAAATGAGCAGTGCGAACGCGT  
481 CAGCGTTCGCACTGCGAACCAATAATATATTATATTATATTATATTATTGGACTCTGGTG  
541 CGAACGCCGAGGTGAGCCAATCGGATATGGCGATATGTTATCACGTGACATGTACCGCCC  
601 CAAATTCGCACTTGAGTSTTGGGGGTACATGTGGGGGCGGCTCGGCTCTTGTGTATAAAA  
661 GAGCGGCGGTTGCGAGGTTCCCTTCTCTCTTCGCGATGCTCTCTCAGAATGGCACGGCCGA  
721 TCCCCCATATATTTTCTGAAGGAACGCATAGCTAGGCGACGAACGAGCTGAATTTCTCCC  
781 TTCATCAAATAAGTAATAAA

Figure 34



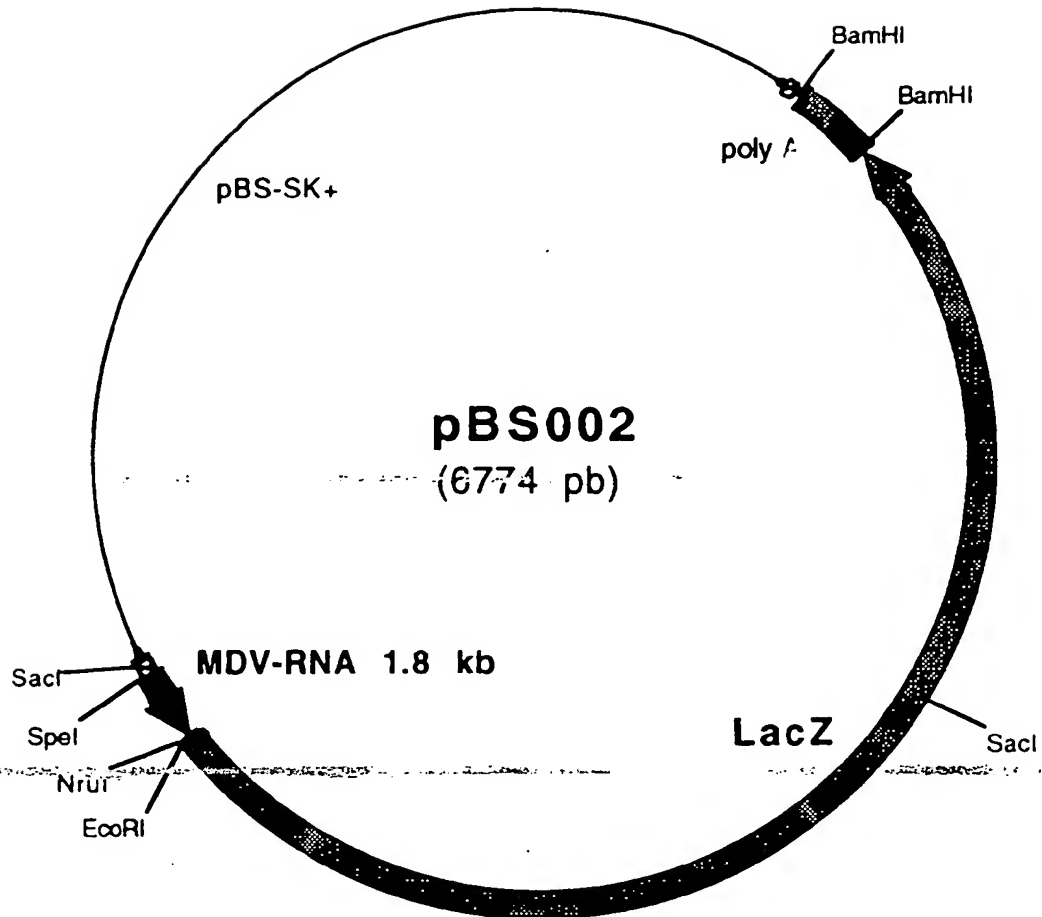


Figure 35

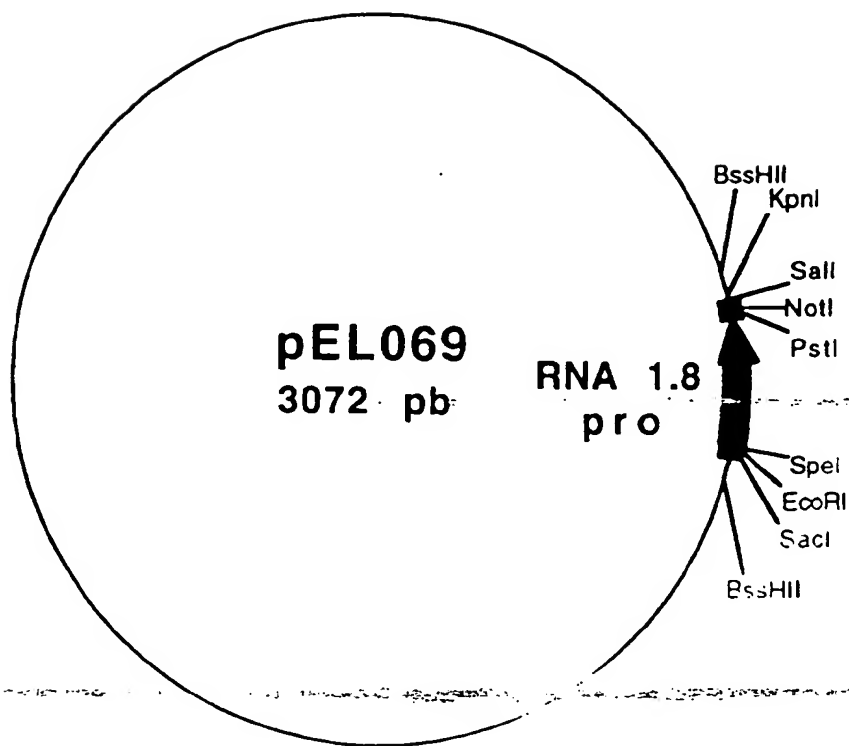


Figure 36

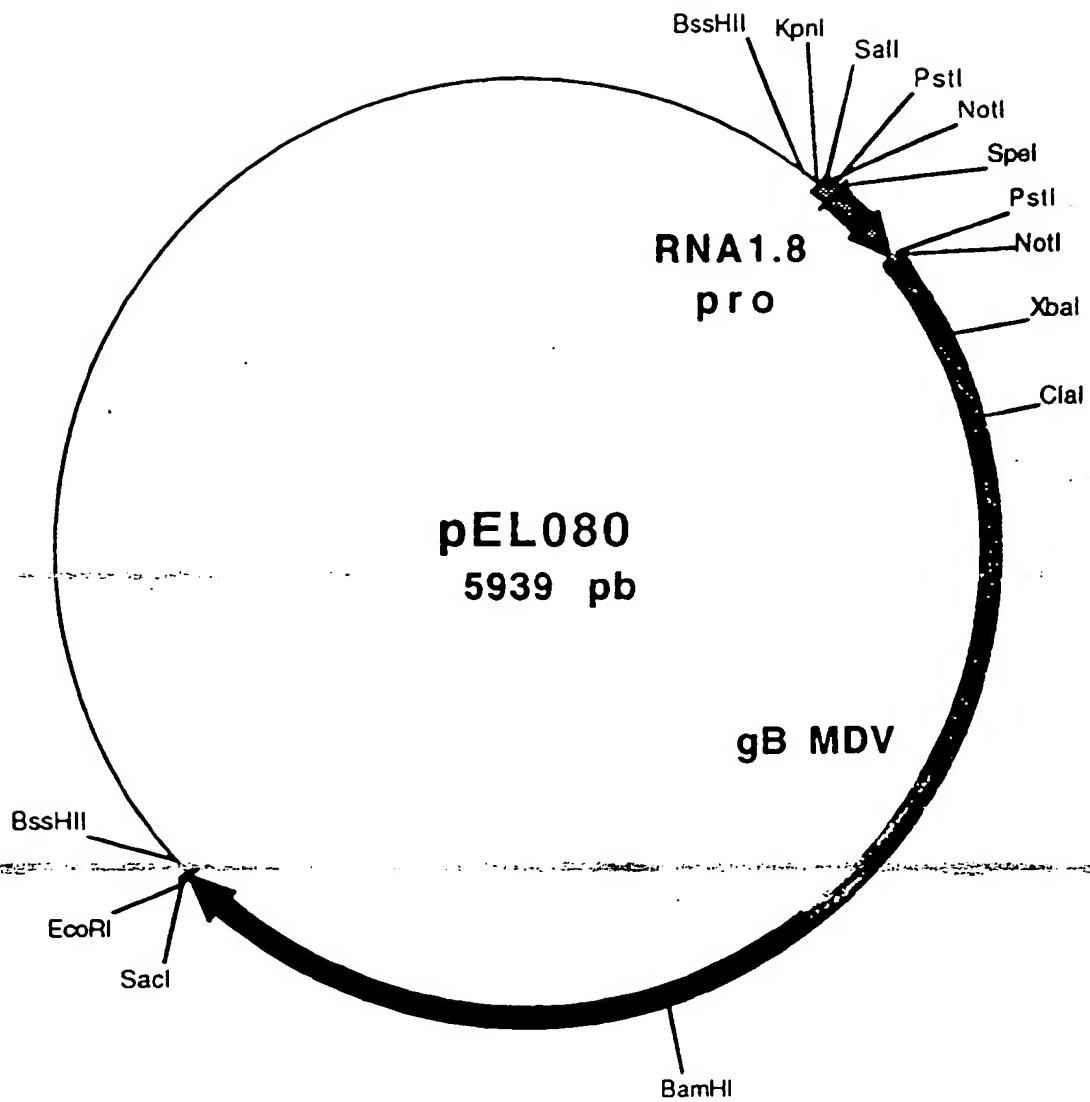


Figure 37

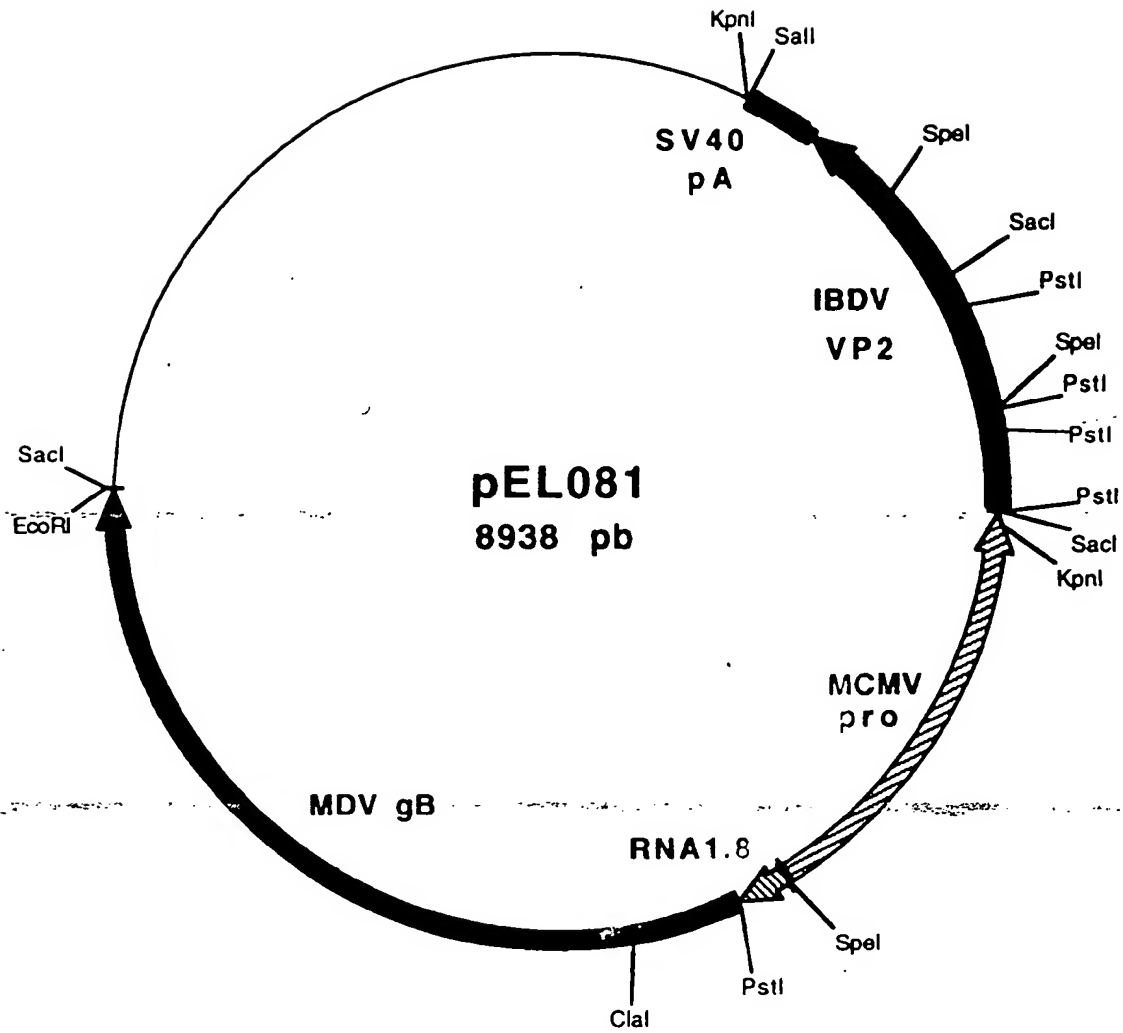


Figure 38

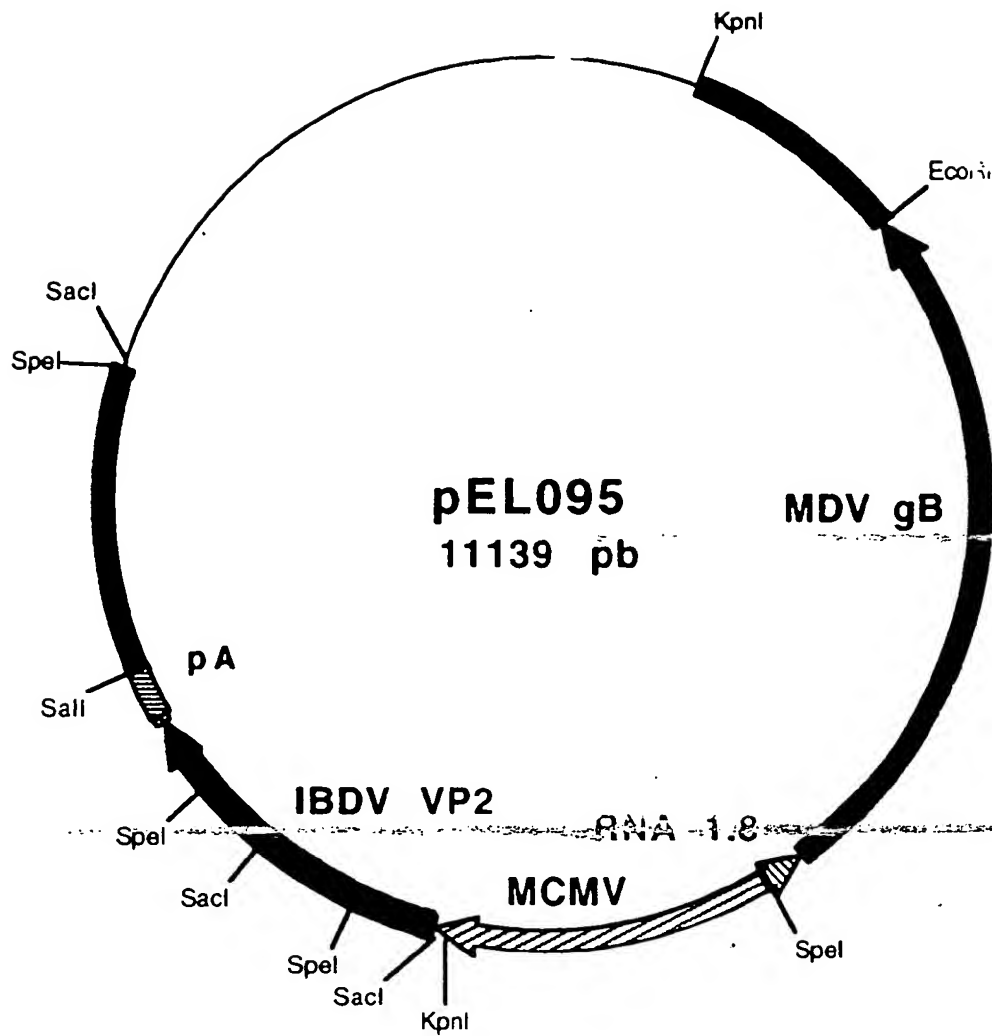


Figure 39

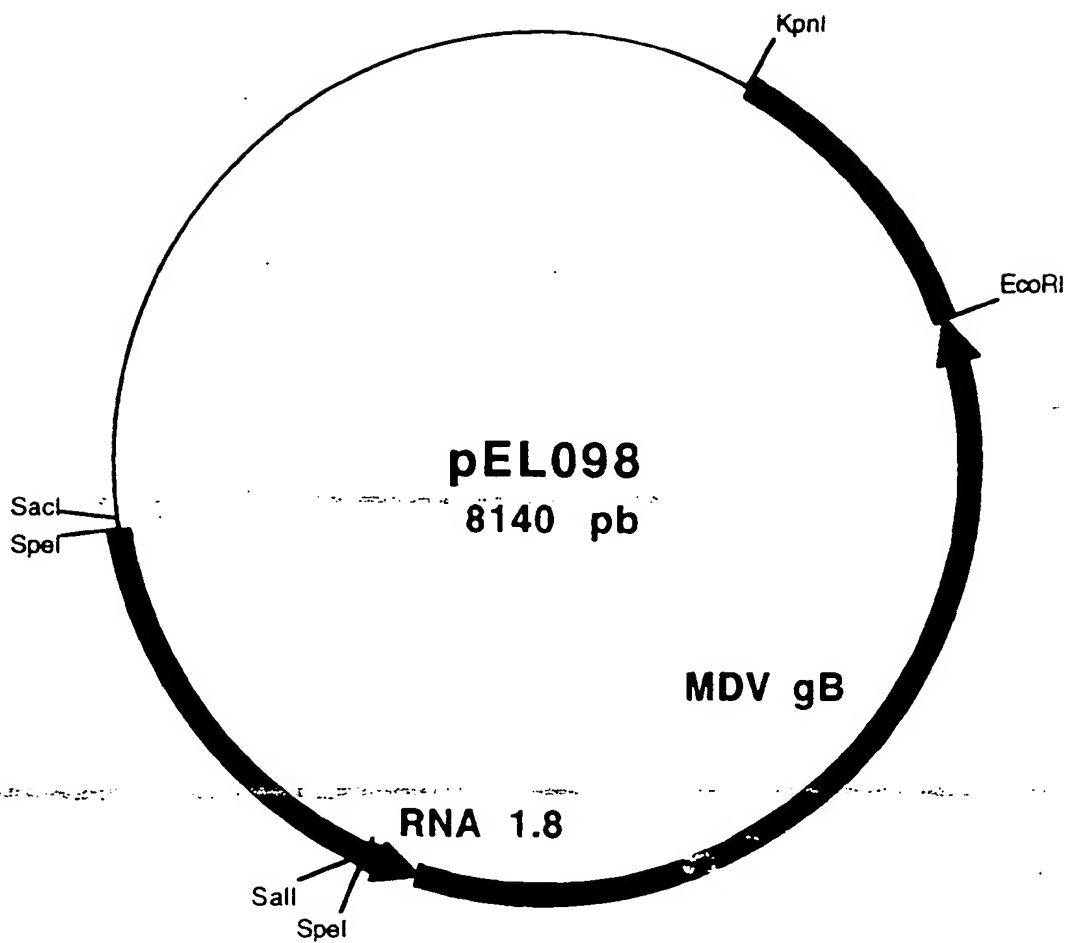


Figure 40

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 719 864 A3

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(88) Date de publication A3:  
04.12.1996 Bulletin 1996/49

(43) Date de publication A2:  
03.07.1996 Bulletin 1996/27

(21) Numéro de dépôt: 95402970.8

(22) Date de dépôt: 28.12.1995

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/86, C07K 14/055,  
C07K 14/125, C07K 14/165,  
A61K 39/255, A61K 39/17,  
A61K 39/215

(84) Etats contractants désignés:  
BE DE ES GB IE IT NL PT

(30) Priorité: 30.12.1994 FR 9416017

(71) Demandeur: RHONE MERIEUX  
69002 Lyon (FR)

(72) Inventeurs:  
• Audonnet, Jean-Christophe, Francis  
F-69006 Lyon (FR)  
• Bublot, Michel Joseph Marie  
F-69290 Saint-Genis-Les-Ollieres (FR)

• Darteil, Raphael Jean  
F-69007 Lyon (FR)  
• Duinat, Carole Véronique  
F-69007 Lyon (FR)  
• Laplace, Eliane Louise Françoise  
69600 Oullins (FR)  
• Riviere, Michel Albert Emile  
F-69130 Ecully (FR)

(74) Mandataire: Polus, Camille et al  
c/o Cabinet Lavoix  
2, Place d'Estienne d'Orves  
75441 Paris Cedex 09 (FR)

(54) Vaccin vivant recombinant aviaire, utilisant comme vecteur un virus herpès aviaire

(57) Le vaccin vivant recombinant aviaire comprend, comme vecteur, un virus herpès aviaire comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans la région comprise entre l'ATG de l'ORF UL55 et la jonction de U<sub>L</sub> avec la région répétée adjacente, sous le contrôle du promoteur CMV immediate early. Le vecteur est choisi de préférence parmi le groupe consistant en virus de la maladie de Marek (MDV et HVT), virus de la laryngotrachéite infectieuse ILTV et herpès du canard. Une formule de vaccin multivalent comprend au moins deux vaccins de ce type, avec des séquences insérées différentes.

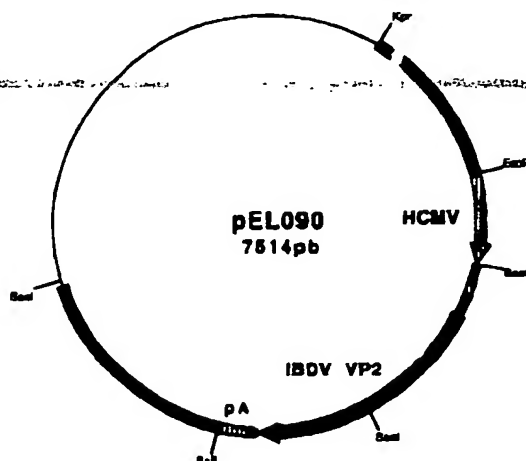


Figure 16



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande  
EP 95 40 2970

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 69, no. 8, Août 1988, pages 2033-2042, XP002012703 BUCKMASTER, A.E. ET AL.: "Gene sequence and mapping data from Marek's Disease Virus and Herpesvirus of Turkeys: Implications for Herpesvirus classification" * figure 3 *	1	C12N15/86 C07K14/055 C07K14/125 C07K14/165 A61K39/255 A61K39/17 A61K39/215
D,A	VIROLOGY, vol. 203, no. 1, 15 Août 1994, pages 125-133, XP002012704 ISFORT, R.J. ET AL.: "Integration of multiple chicken retroviruses into multiple chicken herpesviruses: herpesviral gD as a common target of integration" * figure 4 *	1	
A	EP-A-0 361 182 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) * le document en entier *	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)  C12N C07K
D,A	EP-A-0 447 303 (RHÔNE MERIEUX S.A.) * le document en entier *	1	
D,A	WO-A-93 25665 (SYNTRON CORPORATION) * le document en entier *	1	
A	EP-A-0 473 210 (AKZO N.K.) * le document en entier *	1	
D,A	FR-A-2 666 589 (RHÔNE MERIEUX S.A.) * le document en entier *	1	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 5 Septembre 1996	Examinateur Chambonnet, F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande  
EP 95 40 2970

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
P,X	VIROLOGY, vol. 211, no. 2, Février 1995, ORLANDO US, pages 481-490, XP000601543 DARTEIL, R. ET AL.: "Herpesvirus of Turkey Recombinant Viruses expressing Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens" * le document en entier *	1-16	
A	EP-A-0 477 056 (RHONE MERIEUX) 25 Mars 1992 * le document en entier *	1	
A	FR-A-2 697 534 (RHONE MERIEUX) 6 Mai 1994 * le document en entier *	1	
A	WO-A-92 03554 (WEBSTER ARTHUR PTY LTD) 5 Mars 1992 * le document en entier *	1	
T	WO-A-96 21034 (RHONE MERIEUX ;AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRANC (FR); BUBLOT MICHEL) 11 Juillet 1996 * le document en entier *	1	
T	WO-A-96 05291 (SYNTRO-CORP) 22 Février 1996 * le document en entier *	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche <b>LA HAYE</b>		Date d'achèvement de la recherche <b>5 Septembre 1996</b>	Examinateur <b>Chambonnet, F</b>
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons @ : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**